مقدمة

زرعت لأول مرة أجنة بعض نباتات العائلة الصليبية Cruciferea لإنتاج نباتات معملية (Hannig, 1904) ومنذ عام (١٩٢٠) نجحت زراعة نباتات الأوركيد فى المعمل بواسطة البذور والقمم النامية والأنسجة والخلايا والبروتوبلاست والمتوك وحبوب اللقاح والكالس. وحقق (White 1934) نجاحا فى إكثار الطماطم والتبغ بزراعة عقل جذرية على بيئة غذائية. وأثبت Skoog and Miller (1957) أهمية الأكسينات والسيتوكينينات فى البيئة الغذائية فى تحديد اتجاه وطبيعة نمو الجزء النباتى. وأنتج Steward, et al. (1958) نباتات من خلايا كالس الجزر. وأحدث Murshige and Skoog (MS) (1962) تطورا عظيما فى تركيب البيئة الغذائية المسجلة باسمهما. وتعتبر الآن بيئة (MS) من أشهر البيئات المستخدمة فى إكثار نباتات ذات الفلقة الواحدة وذات الفلقتين وعديد من الأصناف والأنواع النباتية التىكان يصعب إكثارها خضريا. ولذلك تعتبر تقنية زراعة الأنسجة وسيلة للإكثار الخضرى يستخدم فيها أى جزء نباتى مفصول من ورقة أو ساق أو جذر أو زهرة، وقد يكون ذلك الجزء خلية أو نسيجا أو عضوا أو حبوب لقاح أو متوكا أو بيضة. وأثبتت زراعة الأنسجة نجاحا كبيرا فىمجالات البحث العلمى والإنتاج التجارى لنباتات الخضر والفاكهة والزينة والأشجار الخشبية والشجيرات. بينما لم يكن لها نفس النجاح فى إنتاج محاصيل الحقل، وقد يرجع ذلك إلى التغييرات الوراثية غير المرغوبة التى تحدث تلقائيا أثناء نموها على البيئة الغذائية فى المعمل. وبفضل تطبيق تقنية زراعة الأنسجة تم التغلب على ظواهر كثيرة مثل عدم التوافق وموت الأجنة مبكرا والسكون ومواعيد الزراعة والظروف البيئية غير المناسبة. وبدأت التجارب والأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية فى مصر فى أوائل السبعينات من القرن العشرين. وفى أوائل الثمانينات أُنْشِئ "مشروع تطوير النظم الزراعية" بمركز البحوث الزراعية– وزارة الزراعة، بهدف إنتاج تجارى للبطاطس والفراولة

والموز خالية من الأمراض الفيروسية وتوفير العملة الأجنبية اللازمة لاستيراد التقاوى سنويا. ثم أضاف المشروع إلى اهتمامه كثيرا من نباتات الخضر والفاكهة والزينة ذات القيمة الاقتصادية. وتحققت نجاحات كثيرة فى مجالات الدراسات الفسيولوجية واستحداث الطفرات وإكثار النباتات ذات القيمة الاقتصادية. وانتشرت معامل زراعة الأنسجة فى الجامعات والمراكز البحثية والقطاع الخاص لمواكبة هذا النشاط والمشاركة فى تغطية الاحتياجات المحلية والتصديرية. وحرصت هيئة الطاقة الذرية على أن تشارك بمجهودها فى هذا المجال، كأحد أنشطتها فى المجال السلمى للطاقة الذرية. فأنشأت شعبة التكنولوجيا الحيوية بالمركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الإشعاع. وفى أوائل التسعينات من القرن العشرين كان لتطبيق زراعة الأنسجة واستحداث الطفرات النباتية باستخدام الإشعاع نصيبا من هذا الاهتمام. وهذه المادة العلمية مقدمة لكل المهتمين بمجال زراعة الأنسجة لعلها تسهم فى تحقيق طموحاتهم العلمية ومشاريعهم التجارية، راجيا من الله أن يكون فى ذلك تحقيق لقول رسول الله صلى الله عليه وسلم "إن لله عبادا اختصهم بقضاء حوائج الناس، حببهم فى الخير وحبب الخير إليهم، إنهم الآمنون من عذاب الله يوم القيامة" صدقت يارسول الله.

المؤلف

أ.د. محمود توفيق محمد شرباش

شكر وتقدير

يتقدم المؤلف بوافر الشكر والتقدير للدكتورة/ أمينة عبد الحميد على أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية بقسم المنتجات الطبيعية. شعبة التكنولوجيا الحيوية، هيئة الطاقة الذرية، على إخلاصها وحسن تعاونها فى إخراج هذا الكتاب.

مع أطيب التمنيات لسيادتها بدوام التوفيق والرقى.

المؤلف

أ.د. محمود توفيق محمد شرباش

الباب الأول

إنشاء معمل زراعة الأنسجة النباتية

التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة

عند التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة يستلزم أن يؤخذ فى الاعتبار العناصر الآتية:

١- المساحة المخصصة للمعمل.

٢- تحديد الهدف من إنشاء المعمل إن كان للبحث العلمىأو للإنتاج التجارى.

٣- تحديد مجالات الإنتاج إن كانت شاملة لأنواع كثيرة من النباتات أو متخصصة فى بعض النباتات دون غيرها.

٤- تحديد تتابع المعامل والحجرات طبقا لتخصصاتها وارتباطها فى تسلسل خطوات حركة العمل المتوقعة.

٥- تحديد متطلبات المعمل من الأجهزة ومستلزمات التشغيل.

٦- طريقة توزيع وتثبيت مواقع الأجهزة ومستلزمات التشغيل داخل الحجرات والمعامل المخصصة لها.

٧- تحديد متطلبات المعمل من المتخصصين والمشرفين والعمالة وغيرها.

مكونات معمل زراعة الأنسجة

(أ) مكونات إنشائية

١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى.

٢- حجرة الغسيل والنظافة. وحدة تحضير البيئات الغذائية. وحدة الزراعة المعملية (معمل الحقن) وحدة النمو. وحدة الكشف عن الأمراض.

٣- مجموعة حجرات خاصــة بأجهزة التعقيم والحضانات والموازين والثلاجات والديب فريزر والفحص المجهرى (ميكروسكوب)، وجهاز قياس الأس الهيدروجينى pH-meter.

٤- مخزن للأدوات بعد غسـلها وتعقيمهـا وحمايتها من إعادة التلوث. ومخزن لستلزمات التشغيل مثل الأوانى الزجاجية والكيماويات والبيئات المختلفة. ومخزن للكحولات والمذيبات والبيئات سابقة التجهيز.

٥- حجرات خاصة للإداريين والمتخصصين والفنيين المساعدين.

(ب) ملحقات معمل زراعة الأنسجة

(أ) أرض زراعية لزراعة الشـتلات فى أصص أو أكياس بلاسـتيك للوصول بها إلى الحجم المناسب للتسويق.

(ب) صوبة مزودة بأجهزة تحكم فى الإضاءة والحرارة والرطوبة والرى والتهوية، ومحميـة من الحشـرات والآفات. ومرفـق بها مخازن لـلأدوات والأوانى الزراعية والأسـمدة والمبيدات. وللصوبة أهمية كبيرة فى:

١- أقلمة النباتات بعد خروجها من معمل زراعة الأنسجة.

٢- إكثار وتربية نباتات الأم، وهى نباتات تعتبر مصدرا آمنا يفصل منها الأجزاء المطلوبة للزراعة المعملية.

مواصفات وحدات معمل زراعة الأنسجة

١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى

هى حجرة تحتوى على اثنين من المولدات الكهربائية، أحدهما أساســى والثانى احتياطــى، لضمان توفير تيــار كهربائى مســتمر بالقدر الكافى للإضاءة وتشــغيل الأجهزة، مع توفير أجهزة إنذار عن الأعطال المفاجئة .

٢- حجـرة الغسيل Washing room

هــى حجرة خاصة لاســتقبال العينـــات النباتية القادمة مــن الصوبة أو الحقل. ويتــم فيها تهذيــب العينات النباتية للوصول بها إلى الحجم المناســب للعينة، ثم غسلها وتنظيفها للتخلص من الأتربة وجميع العوالق. وتتجمع فيها الأدوات المعملية والأوانى الزراعية المســتعملة للتخلص من بقايا النباتات والآجار وتنظيفها. ويجب أن تقع هذه الحجرة فى مقدمة معمل زراعة الأنســجة ومنعزلة عنه لشــدة تلوثها. ويجب أن يتوفر فيها:

١- مصدر للمياه الباردة والساخنة وأحواض معدنية أو مطلية لا تتأثر بالمنظفات والكيماويات.

٢- غسالة أطباق لغسل الأوانى والأدوات الأخرى، ومجموعة من الأرفف الثابتة والمتحركة للتجفيف.

٣- فرن لتجفيف وتعقيم الزجاجات وأدوات التشريح المعدنية بالحرارة الجافة.

٤- جهاز للتعقيم البخارى تحت ضغط (أوتوكلاف).

٥- أجهزة ثنائيــة التقطير مزودة بأجهزة لإزالة الأيونات ومتصلة بمصدر للمياه الباردة والساخنة.

٦- بعــض الدواليب لحفظ الكيماويات اللازمة لغســيل أوانــى الزراعة والأدوات المختلفة.

٣- وحدة تحضير البيئات الغذائية

Media preparation unit

هذا المعمل لإعداد وتحضير البيئات وتعقيمها وتخزينها مؤقتا لحين تفريغها فى أوانى الزراعة المعملية مثل الأطباق البترى والدوارق المخروطية والبرطمانات. ويثبت

فى وسط المعمل منضدة عمل ترص عليها أوانى الزراعة المعملية وجهاز توزيع البيئة الغذائية. ويستلزم لهذا المعمل وجود:

١- جهـاز ثنائى التقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات وأوتوكلاف للتعقيم ومصدر للمياه البأردة والسـاخنة. ودواليب لتخزين الأوانى الزجاجية والكيماويات اللازمة لتكوين البيئة الغذائية والأدوات المعملية.

٢- بنشـات جانبية يثبت عليها بعض الأجهزة مثل ميزان كهربائى حساسـية ٠,١ جرام للأوزان الكبيرة نسـبيا. وميزان آخر حساس (ملليجرام) للأوزان الدقيقة. وجهاز قياس تركيز أيون الهيدروجين pH-meter . ومقلب مغناطيسى بمسطح ساخن وفرن ميكروويف لإسالة البيئة.

٤- وحدة الزراعة المعمليـة (حجرة الحقن)

Inoculation room

هى حجرة خاصة للزراعة المعملية. ويجب أن تكون معزولة عن مكونات المعمل. وتتميز بمسـتوى عال من النظافة والتعقيم، وتحتـوى على كابينة الحقن Laminar air-flow cabinet. ويجب أن يتوفر فيها الآتى:

١- أن تكون أرضيتها وجدرانها وما تحتويه من المناضد والأرفف قابلة للغسـيل والتعقيم بالماء والمعقمات.

٢- أن تكون مزودة بجهاز تكييف يعمل ذاتيا إذا ارتفعت الحرارة عن المدى المطلوب.

٣- يثبت بالحجرة لمبات أشعة فوق بنفسجية (UV) للتعقيم، ويثبت واحدة منها فى سقف الحجرة .

الاحتياطات الواجبة فى حجرة الحقن

١- تعتـبر أحذية وملابس الزائرين مصدرا هامـا للتلوث، لذلك يجب تغطيتها بغطاء معقم من البلاسـتيك أو غمس نعلها فى محلول معقم قبل دخول المعمل ولبس بلاطو على أن تعقم أرضية الحجرة يوميا.

٢- على العاملين بالمعمل غسـل الأيدى والأجزاء المكشـوفة مـن الأذرع بانتظام بالصابـون ثم تعقيمها بكحول ٩٦٪. و يسـتخدم العاملون بالمعمل أحذية وبلاطى- معقمة مقرها الدائم داخل حجرة الحقن.

٣- عدم اسـتخدام الكابينة للتخزين أو إدخال مواد ملوثة للمعمل، وعدم إدخال مستخدم الكابينة رأسه داخلها.

٤- تغيير الأدوات المعملية المسـتعملة بانتظام ووضعها بعد اسـتعمالها مباشـرة فـى كحول ٩٦٪. واسـتبعاد الأوانى المحتوية على بيئات ملوثة بسـرعة. وتجمع المخلفات فى أكياس بلاستيك، ويتخلص منها فورا وبانتظام.

٥- حجرة النمو (وحدة الزراعة)

Growth room (Culture unit)

هى حجرة تنقل إليها الأجزاء النباتية بعد زراعتها فى بيئة غذائية منشطة للنمو وتكويـن الأعضاء. وتحتوى هـذه الوحدة على منضدة لفحص وتتبع نمو المزروعات. وقد يستلزم توفير أكثر من حجرة نمو خصوصا إذا تعددت اهتمامات المعمل وامتدت إلى أنواع نباتية أخرى مختلفة فى احتياجاتها الحرارية والضوئية. وحينئذ قد تقسم حجرة النمو إلى وحدات صغيرة بواسطة عوازل محكمة مع وضع مسمى خاص لكل منها مثل:

١- حجـرة الاسـتبداء Initiation room: وهـى وحدة تنقـل إليها الأجزاء النباتية عقب زراعتها مباشرة. وتحضن فى ظلام تام أو ضوء ضعيف ودرجة حرارة مناسبة حتى يكتمل تكوين الكالس.

٢- حجـرة النمو Growth room: وينقـل إليها الكالس بعد تكوينه ويحضن عند درجة حرارة وطول فترة ضوئية وشـدة إضاءة مناسـبة لتكشف الأعضاء النباتية ونموها.

مستلزمات الإضاءة فى حجرة النمو

١- تستخدم لمبات فلورسنت كمصدر ضوئى تتناسب شدته وفقا لكثافة واحتياج المزروعات. ويتم التحكم فى شدة الإضاءة فى بعض الأماكن داخل حجرة التنمية بإضعافها أو حجبها بالكامل وفقا لاحتياج النباتات .

٢- تثبت لمبات الفلورسنت أفقيا تحت الأرفف (فوق النباتات) أو عموديا على جوانب الأرفف لانتظام توزيع الإضاءة بين النباتات وتجنب ارتفاع الحرارة فى الأماكن القريبة من اللمبات.

٣- الترنسات الخاصة بلمبات الفلورسنت تعتبر مصدرا لانبعاث الحرارة، لذلك يفضل تثبيتها خارج حجرة النمو.

٤- توفير جهاز توقيت لضبط توالى عدد ساعات الإضاءة والظلام طبقا لحاجة النباتات.

٥- توفير جهاز لقياس شدة الإضاءة Lux- meter. وجهاز إنذار عن الأعطال المفاجئة فى التيار الكهربائى.

تثبيت الحرارة فى حجرة النمو

١- يثبت جهاز تكييف مركزى للتحكم الكامل فى درجات الحرارة داخل جميع وحدات معمل زراعة الأنسجة، وضبطها عند ١٧- ٢٧°م. لذلك يفضل تركيب جهاز تكييف احتياطى داخل كل وحدة من وحدات المعمل للتشغيل إذا حدث عطل مفاجئ لجهاز التكييف المركزى.

٢- توفير جهاز إنذار للتنبيه عن الأعطال أو الخلل المفاجئ فى جهاز التكييف المركزى.

٣- ضرورة التأكد من التهوية الجيدة بين الأرفف الحاملة للأوانى المزروعة حتى لا ترتفع الحرارة بينها. ويفضل استخدام أرفف معدنية مفتحة مع المحافظة على زيادة حركة الهواء داخل الحجرة وبين الأرفف.

٤- تثبيت جهاز أمان بكل حجرة يقوم بفصل الإضاءة إذا كانت هى السبب فى ارتفاع الحرارة.

٦- وحدة الكشف عن الأمراض

هى وحدة خاصة للكشف عن الأمراض الفيروسية والبكتيرية والإصابات الحشرية والنيماتودا التى تصيب النباتات. ويجب أن تكون هذه الوحدة معزولة عن الحجرات السابقة. ويثبت فيها بنشات يوضع عليها أجهزة الكشف عن الفيروسات مثل جهاز ELISA أو جهاز IC-PCR و بينوكلر وميكروسكوب. كما يجب أن يتوفر فيها الأطباق البترى والأدوات المعملية والكيماويات اللازمة للاختبارات الميكروبيية.

احتياجات معمل زراعة الأنسجة النباتية

١- أجهزة ومعدات

- كابينة تيار هواء مستمر (كابينة للحقن) Laminar air-flow cabinet
- حضانات عادية Incubators وحضانات هزازة Shaking incubators
- حضانة بمسطح دائرى الاهتزاز Platform - shaker incubator
- أجهزة تعقيم بالضغط البخارى Autoclaves
- أفران تجفيف Ovens مختلفة الأحجام للتجفيف والتعقيم.
- فرن ميكروويف Microwave لتسخين وإسالة البيئة الغذائية والآجار والعينات المجمدة.
- جهاز تبريد عميق (-٢٠°) Deep freezer.
- ثلاجات عادية لتخزين البيئات الغذائية والمواد الكيميائية مثل الهرمونات والفيتامينات.
- جهاز ثنائى التقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات Deionizer Bi-distiller

- جهاز طرد مركزى بطىء السرعة Low speed Centrifuge
- جهاز قياس الأس الهيدروجينى pH-meter
- حمامات مائية مختلفة الأحجام.
- غسالة أطباق ذاتية التشغيل Dishwasher وغسالة ماصات مقاومة للأحماض Pipette washer.
- مقلب مغناطيسى عادى Magnetic stirrer ومقلب مغناطيسى بمسطح ساخن.
- موازين عادية ذات حساسية ٠,٠١ جرام و ذات حساسية ٠,٠١ ملليجرام.
- موزع للعينات ذاتى التشغيل Automatic dispenser
- خلاط للعينات الكبيرة Blender
- ميكروسكوب استريو Stereo- microscope
- جهاز توقيت Timer لضبط وقت التعقيم.

مستلزمات تشغيل

- مواد كيميائية داخلة فى تكوين البيئة الغذائية من أملاح معدنية ومنظمات النمو وآجار ومنظمات للنمو.
- بيئات غذائية مختلفة جاهزة التركيب.
- مواد معقمة مثل هيبوكلوريت الصوديوم وهيبوكلوريت الكالسيوم وكحول إيثانول ٩٦٪.
- خطوط لإمداد الغاز والماء والهواء المضغوط وخطوط لتفريغ الهواء ومصدر للبخار Steamer وخطوط كهرباء فى جميع المعامل وكابينة الحقن.
- نظام مرشح دقيق Millipore filter system
- حاويات معدنية للأطباق البترى والماصات تستخدم أثناء تعقيمها فى جهاز الضغط البخارى.

- أدوات زجاجية وبلاستيكية عيارية وغير عيارية مثل المخابير ودوارق مخروطية ودوارق ستيوارد Steward flask وكئوس وماصات وسحاحات وأنابيب اختبار مختلفة الأحجام ويفضل أحيانا أنابيب بغطاء قلاووظ Screw-top، وأطباق بترى Petri dishes وزجاجات لبن وبرطمانات مربى وزجاجات حفظ ومجففات Desiccator وخزان للماء المقطر والماء الخالى من الأيونات.

مستلزمات الغسيل والنظافة

- حوض غسيل مضاد للأحماض وتروللى لنقل المعدات .
- أدوات نظافة مثل الفوط والفرش. ومواد تنظيف الأدوات الملوثة مثل حمض الكبريتيك والكروميك ومطهرات.
- حوامل معلقة لتجفيف الأدوات المعملية مثل الدوارق والبرطمانات بعد غسلها.
- سدادات قطن وورق ألومنيوم وأفلام بلاستيك وأغطية أنابيب معدنية لغلق الأنابيب.
- ورق ألومنيوم Aluminum foil وورق ترشيح Filter papers وفيتا فيلم Vita film أو ما يماثله للف وتغطية الصناديق والحوامل وغيرها.

تستخدم فى المعامل التجارية لزراعة الأنسجة أدوات ومستلزمات خاصة بالتكاثر مصنوعة من البلاستيك لانخفاض سعرها وسهولة تداولها. ويؤخذ فى الاعتبار أن أنابيب الاختبار حجمها أكبر ومسطح البيئة داخلها أصغر ولكن التهوية داخلها منخفضة وهذا يقلل من تعرض البيئة للجفاف والتلوث. بينما الأطباق البترى لها حجم أصغر نسبيا ومسطح أكبر وتهوية أفضل مما يعرض البيئة بها لسرعة الجفاف والتلوث. لذلك يفضل إحكام غلق الأطباق البترى بشرائط من البارا فيلم أو ما يماثلها. والدوارق الكبيرة أفضل للنمو من الدوارق الصغيرة، حيث تزداد فيها كمية البيئة الغذائية المستخدمة فى وحدة المساحة مما يؤدى إلى انخفاض تجمع غازات ثانى أكسيد الكربون والإيثلين حول الأجزاء النباتية المزروعة.

الباب الثانى

التعقيم Sterilization

يجب المحافظة على نظافة وتعقيم معمل زراعة الأنسجة وخاصة حجرة الحقن ومعمل النمو. لأن التلوث يعنى فساد المزروعات وضياع الوقت والمجهود وفقْدًا للكيماويات.

مصادر تلوث معمل زراعة الأنسجة

١- تلوث المواد الكيميائية الداخلة فى تركيب البيئة والأدوات المستخدمة فى تداولها ، لذلك يجب تخصيص أدوات محددة لكل مادة كيميائية لمنع انتقال التلوث من مادة كيميائية إلى أخرى.

٢- عدم نظافة وتعقيم الأدوات المستعملة وعدم نظافة وتعقيم الأرضيات وعدم إزالة المخلفات بسرعة من المعمل وعدم اهتمام العاملين بالنظافة الشخصية.

٣- النوافذ والأبواب غير محكمة الغلق التى تسمح بدخول الأتربة إلى المعمل هى من المصادر الهامة للتلوث.

ويجب أن يتوفر فى المعمل دقة التصميم الهندسى لمنع نفاذ الأتربة إلى داخله.

١- تعقيم حجرة الحقن

Sterilization of inoculation room

١- تنظف منضدة الكابينة بالكحول ٩٦٪ ، ولا يستخدم كحول ٧٠٪ حتى لاتترك قطرات من الماء بعد تطاير الكحول وتصبح مصدرا للتلوث. ثم تجفف الكابينة بقطعة من القماش الجيد الذى لا يترك أية بقايا.

٢- يفضل تشغيل الكابينة لمدة ١٥ دقيقة قبل بدء العمل للتأكد من سلامتها.

٣- تترك أحيانا لمبات الأشـعة فوق البنفسجية (UV) مضاءة طوال الليل لتعقيم حجرة الحقن ومحتوياتها قبل استخدامها فى اليوم التالى، وقد يفضل إضاءتها قبل بدء العمل بفترة لا تقل ولا تزيد عن ٣٠ دقيقة مع التأكد من غلق الأبواب بإحكام. ويجب عدم النظر إليها أثناء تشغيلها لحماية العين من الأضرار.

كابينة تيار الهواء المعقم Laminar flow hood

يتـم فى هذه الكابينة فصل الأجزاء النباتية وزراعتها فى أوعية الزراعة المعملية. ويجب أن يتوفر فيها التعقيم التام أثناء إجراء الزراعة. وتتميز هذه الكابينة بقدرتها على تنقية وتعقيم الـهواء المار بداخلها. حيث يمر الهواء الجوى بضغط ثابت خلال مرشـحات أقل من ميكرون لمنع مرور ذرات التراب وما تحمله من كائنات دقيقة، ثـم يمر الهواء داخل الكابينة بعـد أن يصبح على درجة عالية من النقاوة والتعقيم. ويجب تغيير الفلتر بآخر جديد سنويا. ويثبت فى سقف الكابينة لمبات فلوروسنت كمصـدر للإضاءة. ويتوفـر فى الكابينة مصدر غاز يسـتخدم كلهب لتعقيم الأدوات المستخدمة فى الزراعة والحقن أو يستخدم بدلا منه مصباح كحولى.

٢- نظافة وتعقيم الأدوات المعملية

١ - نظافة الأدوات الزجاجية

تنظـف الأوعيـة الزجاجيـة والأدوات المعملية فـى حجرة الغسـيل. وتنظف الزجاجيات الجديد منها الذى لم يسـبق اسـتعماله فى إناء يحتوى على خليط من حمـض الكروميك وحمض الكبريتيك أو منظف صناعى. ثم تغسـل تحت تيار ماء جار لفترة لا تقل عن ٥ دقائق يعقبها غسـيل بماء مقطر معقم مرتين متتاليتين، ثم تحفظ جميعها بعيدا عن الأتربة. ويعاد غسـلها مرتين بالماء المقطر قبل استخدامها إذا خزنـت لفـترة طويلة. فإذا تلوثـت الأرضية بمخلوط الحامضـين المذكورين أو

كليهما فتنظف باستخدام مصدر مائى ذى ضغط عالٍ. لذلك يجب أن تكون أرضية المعمل مقاومة للأحماض. ويجب استعمال قفازات وبلاطٍ مقاومة للأحماض. وتنظف الزجاجيات المستعملة بسرعة قبل جفاف الآجار والتصاقه بجدار الوعاء. ويبدأ تنظيف الأنابيب بإزالة السدادات ثم توضع فى ماء ساخن. ويستخدم ملقاط وفرشاة مناسبة للتخلص من الآجار وبقايا النباتات الموجودة فى الأنابيب. ويفضل استخدام غسالة أطباق لغسل الأوانى الزجاجية، ثم تشطف بماء مقطر خالٍ من الأيونات، ثم تجفف جيدا فى فرن تجفيف بعد التأكد من نظافتها، ثم تخزن بسرعة بقدر الإمكان لتقليل فرصة تلوثها.

٢ - تعقيم الأدوات المعملية

الأدوات المعملية تشمل جميع الأوانى الزجاجية والبلاستيكية المستخدمة فى الزراعة والأدوات الأخرى مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها. ويتم التعقيم بأشعة جاما أو بالضغط البخارى باستخدام الأوتوكلاف أو بالحرارة الجافة. ولا تستخدم الأوعية البلاستيكية منخفضة الجودة إلا مرة واحدة لأنها لا تتحمل حرارة التعقيم المرتفعة، ولها عمر افتراضى تصبح بعده غير صالحة للاستعمال. ويستخدم الإشعاع بنجاح فى تعقيم الأدوات المعدنية والأوانى الزجاجية والبلاستيكية بصرف النظر عن جودتها. ويفضل استخدام الأوتوكلاف أو أفران الحرارة الجافة فى تعقيم الأوانى الزجاجية. والأوانى البلاستيكية التى تتحمل حرارة التعقيم عادة مرتفعة الثمن وتعقم مثل الزجاجيات ولها بعض المشاكل مثل انبعاث الإيثلين منها، وهو مركب ضار للبيئة وسام للنباتات. وتعقم الأدوات الزجاجية بالحرارة الجافة فى فرن حرارته ١٥٠ °م لمدة ساعة واحدة، على أن تكون من الزجاج المقاوم للحرارة مثل Pyrex أو بوروسليكات Borosilicate وهى مرتفعة الثمن، والأنواع الرخيصة منها لا تتحمل الحرارة المرتفعة، وينفرد منها كاتيونات سامة مثل الصوديوم والرصاص والزئبق إلى البيئة الغذائية. ويستخدم الزجاج البيركس بصفة خاصة لزراعة البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب الأخذ فى الاعتبار ما يلى:

١- تغلف الأدوات المعملية مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها بورق ألومنيوم قبل تعقيمها فى الأوتوكلاف، وتظل مغلفة بعد تعقيمها للحفاظ عليها معقمة حتى وقت استعمالها. وتوضع الماصات والحقن داخل علب خاصة بها ثم تغلف كل علبة بورق ألومنيوم للمحافظة عليها بعد التعقيم.

٢- عند الزراعة المعملية يغمس طرف الآلة المستخدمة فى كحول، ثم تعرض إلى لهب من مصباح بنز ثم يوضع فى ماء معقم ليبرد. ويجب عدم وضع أية أداة فى كحول بعد تعرضها مباشرة لمصدر حرارى حتى لا يحدث انفجار أو التهاب للكحول و قد يؤذى القائم بالزراعة المعملية.

٣- يجب عدم ملامسة الأدوات المعملية سطح البيئة الغذائية عند نقل وزراعة الجزء أو النسيج النباتى.

٤- يفضل استخدام ماصات Pipettes أو سرنجات Syringes معقمة لضمان عدم تلوث البيئة الغذائية. وتخصص واحدة منها جديدة ومعقمة لكل نوع من المحاليل المستخدمة.

٥- يجب تغطية الشعر تماما ووضع كمامة فوق الأنف والفم. وتطهير الأيدى وأى جزء آخر مكشوف من الذراع بالكحول حتى لا يكون مصدرا لتلوث البيئات الغذائية والأجزاء النباتية.

٣- تعقيم البيئة الغذائية

Sterilization of nutritional medium

يجب التأكد من نقاوة وتعقيم المركبات الداخلة فى تكوين البيئة ومنع تلوثها. ويفضل تحضيرها قبل الاستعمال مباشرة، ويجب ألا تزيد فترة تخزينها عن ١٤ يوما.

١- التعقيم بالأوتوكلاف

تعقم معظم البيئات الغذائية فى الأوتوكلاف، وهو جهاز تعقيم بخارى تحت ضغط يتميز بسرعة وسهولة التشغيل. ويختلف الأوتوكلاف فى شكله وحجمه فمنه

الأفقـي الذى يتم تحميله من الأمام، والرأسـي الذى يتم تحميله من أعلى. والنوع الأفقى أسـهل استعمالا وأعلى سـعرا. وتصل حرارة التعقيم ١١٥- ١٣٥°م. لذلك فالأوتوكلاف قادر على تحطيم جميع الكائنات الدقيقة والفيروسات. وتعتمد كفاءة التعقيم على مدة التشـغيل والضغط البخارى المستعمل ودرجة الحرارة وحجم المواد المطلوب تعقيمهـا. ويحتاج تعقيم الأحجام الكبيرة من البيئة الغذائية الموجودة فى عبـوة واحـدة إلى فترة زمنية أطول لضمان تجانس توزيع حرارة التعقيم (جدول ١) كذلـك تحتـاج إلى فترة أطول بعد تعقيمها لكى تفقـد حرارتها المرتفعة. وقد يؤدى إطالة فترة التعقيم أو فترة ما بعد التعقيم إلى تلف البيئة أو احتراق بعض مكوناتها مثل السـكر. لذلـك يفضل توزيع البيئة على أنابيـب أو دوارق بمعدل ٢٠- ١٠٠ مللـى لكل منها لضمان اكتمال وتجانس التعقيم وحماية مكوناتها من التغيير. ويتم التعقيم بعد ١٥- ٢٠ دقيقة عند ١٢١°م وضغط بخارى واحد كيلوجرام/ سم٢. وتغلق أنابيـب الاختبار أو الدوارق الزجاجية المحتوية على بيئة غذائية قبل وضعها فى الأوتوكلاف بسـدادة من القطن محاطة بطبقة من الشـاش للمحافظة على تعقيمها بعد التعقيم. وقد تسـتخدم أغطية مخصصـة للأنابيب والدوارق الزجاجية على أن تكـون غير محكمة الغلق لتسـاعد على تمدد الهواء داخلهـا ومنع انفجارها داخل الأوتوكلاف. وقد تسـتخدم أغطيـة تحتوى على نتوءات داخلية تلامس السـطح الخارجى للأنبوبة الزجاجية وتسـمح بتبادل الغازات. ويسـتخدم أيضا قطع مربعة مناسـبة من ورق الألومنيوم سمك ٠,٢٥ ملليمتر؛ حيث توضع قطعة ورق الألومنيوم فـوق فوهة الأنبوبة أو الدورق ثم تطوى أطرافهـا برفق حول محيط العنق، ويؤدى إحكام غلق الأوعية إلى عزل محتواها عن المحيط الخارجى وخلق ظروف لا هوائية داخلها. ويتميز غطاء الألومنيوم بإمكان رفعه وإعادة تعقيمه واستعماله لإضافة مادة كيميائية أو جزء نباتى. ويمكن استخدام غشاء من البوليثين polythene بعد تعقيمه فى ٧٠٪ كحول إيثايل بدلا من ورق الألمونيوم.

ويتوفر فى الأسـواق أجهزة لتحضير وتعقيم كميات ما بين ٠,٥- ١٦ لترا. ويتم تعقيمهـا تحت ضغط بخارى. ويتم خلـط البيئة مع التقليب أثنـاء التعقيم لضمان

الخلط الجيد وإذابة جميع مكوناتها وسـرعة التسخين وتجانس الحرارة فى البيئة. وبعـد التعقيم تبرد البيئة بسـرعة تحـت تيار ماء جار. ثم تضـاف المكونات التى تتحمـل الحـرارة أولا مع التقليب. بعدها تصبح البيئـة معقمة صالحة للتوزيع فى أوانى الزراعة.

جدول (١) مدة التعقيم بالأتوكلاف عند درجة حرارة ١٢١°م

حجم البيئة الغذائية (مللى)٣	الوقت اللازم للتعقيم (دقيقة)
٢٠ – ٢٥	١٥
٢٥ – ٥٠	٢٠
٥٠ – ٥٠٠	٢٥
٥٠٠ – ١٠٠٠	٣٠
١٥٠٠	٣٥
٢٠٠٠	٤٠

سلبيات التعقيم بالأوتوكلاف

(أ) حـدوث تحلـل مائى للسـكروز إلى فركتوز وجلوكوز وسـكريات وأحماض سكرية. وارتفاع حرارة التعقيم أكثر من اللازم قد يؤدى إلى كرملة السكر.

(ب) حـدوث تغيـير فى رقم حموضة البيئـة الغذائية (pH) بمقـدار ٠,٣–٠,٥ وحدة، مما يسبب انفصالا لبعض مكوناتها وحدوث بعض التفاعلات الجانبية بينها وانخفاض فاعليتها.

(جـ) حـدوث تحطيـم لبعـض المركبـات الداخلـة فـى تكويـن البيئـة مثـل الكولشيسـين والزياتـين Zeatin والجبريلين وفيتامـين (B_1) وThiazol وPyrimidine وفيتامـين B (Partothenic) وVitamin C والمضـادات الحيويـة والإيثريـل Ethrel والإيثلين Ethylene .

٢ - التعقيم بالمرشحات Sterilization by filtration

يستخدم للتعقيم مرشحات خاصة مثل Millipore MF filters ذات مسامية ٠,٢٢ ميكروميـتر للتخلص من جميع الجسـيمات العالقة والكائنات الدقيقة، حيث تمرر المحاليل والبيئات السائلة وغيرها خلال أغشية الفلتر.

وتستخدم هذه الطريقة بدلا من التعقيم بالضغط البخارى (الأوتوكلاف). والتعقيم بالترشـيح يـؤدى إلى احتفاظ البيئـة بمكوناتها الغذائية بدون تغيـير ويؤخذ عليه ادمصاص بعض المركبات على سـطح الفلتر، ولذلك يفضل استبعاد الكمية الأولى من الراشـح لاحتمال عدم مطابقته للمواصفات المطلوبة، كما أن بعض الفيروسـات قد تكون صغيرة ولها القدرة على المرور خلال الفلتر.

٤- تعقيم الأجزاء النباتية Sterilization of explants

الأجـزاء النباتية المفصولة من نباتات نامية فـى الحقل عادة تكون ملوثة بأنواع مختلفـة من الكائنات الدقيقة. ويعتبر الهواء والأتربـة ومياه الرى والآفات وغيرها أهم مصادر للتلوث. وزراعة الأجزاء النباتية الملوثة يؤثر تأثيرا سيئا على نمو وتطور النموات. لذلك فتعقيم الأجزاء النباتية القادمة من الحقل شرط أساسى.

خطوات التعقيم

١- يغسـل الجزء النباتى تحت تيار مسـتمر من ماء الصنبور لمدة ١- ٢ سـاعة لتنظيف سطحه الخارجى جيدا والتخلص من الأتربة العالقة عليه وتخفيض الحمل الميكروبى.

٢- يغمـس الجـزء النباتى فى محلول التعقيم للقضاء علـى ما تبقى من الأحياء العالقة على سطحه. واختيار المادة الكيميائية المعقمة والفترة الزمنية المناسبة للتعقيم يعتمد على حساسية الجزء النباتى المراد تعقيمه. ويؤدى التعقيم الشديد إلى التخلص من الكائنات الدقيقة المنتشرة على السطح الخارجى. وقد يؤدى أيضا إلى تدمير بعض

الأنســجة الخارجية للجزء النباتى. لذلك يجب اختيار مادة التعقيم والفترة المناسبة للتعقيم بدقة.

٣- يغسل الجزء النباتى بالماء المقطر المعقم عدة مرات للتخلص من الآثار المتبقية مــن مادة التعقيم. مع الاهتمام بإزالة جميع الأنســجة المتضــررة والتالفة من تأثير مادة التعقيم.

٤- يقطع الجزء النباتى إلى أحجام مناسبة للزراعة المعملية تحت ظروف معقمة، ويستخدم فى ذلك أدوات معقمة جيدا. ثم تزرع الأجزاء النباتية تحت ظروف تعقيم فى أوانى الزراعة مثل أنابيب الاختبار ودوارق مخروطية وأطباق بترى تحتوى على بيئة غذائية. ويراعى أن تكون الأوانى والبيئة الغذائية معقمة جيدا.

تعقيم الأجزاء النباتية بالكيماويات Chemical sterilization

تعقم الأجزاء النباتية ســطحيا باســتخدام مركبات مثــل هيبوكلوريت الصوديوم (NaClO) وهيبوكلوريت الكالســيوم وماء البرومين وفوق أكسيد الإيدروجين ونترات الفضة وكلوريد الزئبق وكحول الإيثايل وأكســيد الإيثلين. ويفضل إضافة ٠,٠٥٪ من مادة ناشــرة مثل Teepol; Trigetol; Tween-20 إلى محلول التعقيم لتســهيل انتشاره على الأســطح الخارجية للأجزاء النباتية وزيادة كفاءته فى قتل الكائنات الدقيقة. ويســتخدم هيبوكلوريت الصوديوم بتركيــز ١٪ بنجاح فى التعقيم لانخفاض أضراره الجانبيــة. حيــث يتحلل هيبوكلوريت الصوديوم إلى كلوريــن ذات الأثر الفعال فى التعقيم، ويتفاعل الصوديوم مع الماء ليكون هيدروكسيد الصوديوم، وهو مركب سهل التخلص منه بالماء. ويحتاج التعقيم من ٥ إلى ٣٠ دقيقة فى محلول ١٪ هيبوكلوريت الصوديــوم. وإطالة فــترة التعقيم قد يكون لها تأثير ضار علــى الجزء النباتى. وقد يســتلزم تغطية الأســطح المجروحة على الجزء النباتى بالبرافين لمنع نفاذ محلول التعقيم إلى الأنســجة الداخلية ومنع خروج الســائل الخلوى. ويســتخدم البرومين بتركيــز ١٪ لتعقيم البذور قبل زراعتها مباشــرة. ويســبب البرومين بعض الأضرار للجنــين إذا كان غلاف البذرة رقيقا. ويســتخدم فوق أكســيد الإيدروجين (H_2O_2)

فى التعقيم، وهو سهل التحلل إلى أكسيجين وماء، وهى شقوق غير ضارة وتتبخر بسهولة. ويسبب هذا المركب بعض الأضرار حيث يفقد النسيج النباتى بعضا من رطوبته أو يؤدى إلى جفافه. ومحلول كلوريد الزئبق المخفف يعقم الأنسجة النباتية بنجاح، خصوصا الأجزاء النباتية المغطاة بطبقة كيوتين أو ذات أسطح غير مستوية. ويؤخذ عليه صعوبة إزالة آثاره المتبقية على الجزء النباتى بالماء. ويمكن إزالته بكحول إيثايل أو مسحوق غسيل أو خليط بينهما. لذلك يجب تحديد فترة التعقيم وتركيز مادة التعقيم المستخدمة لكل نوع نباتى (جدولا ٢، ٣).

جدول (٢) الفترة الزمنية (الدقيقة) والتركيز المناسب من مادة هيبوكلوريت الصوديوم

الجزء النباتى	النبات	مدة التعقيم	هيبوكلوريت الصوديوم ٪
أوراق	Anthurium andreanum	30	1
نسيج	Hyacianthus scale	15	1
سوق	Rhododendron	20	1
أذينات	Gerbera	15	1
براعم زهرية	Freesia	20	1
أوراق	Strelitzia	45	1
بذور	Tulipa	30	2
سوق	Phaseolus	15	1
قمم السوق	Nephrolepis	5	1

جدول (٣) بعض المواد المستخدمة فى تعقيم الأجزاء النباتية

مادة التعقيم	التركيز ٪	مدة التعقيم (دقيقة)	التأثير	سهولة الإزالة*
هيبوكلوريت الكالسيوم	9 - 10	5 - 30	جيد جدا	+++
هيبوكلوريت الصوديوم	2**	5 - 30	جيد جدا	+++
ماء البرومين	1 - 2	10 - 2	جيد جدا	+++
فوق أكسيد الأيدروجين	10 - 12	5 - 15	جيد	++++++
نترات الفضة	1	5 - 30	جيد	+
كلوريد الزئبق	0.1 - 1	2 - 10	مقبول	+
مضادات حيوية	4 - 5 ملليجرام/ لتر	30 - 60	جيد بوجه عام	++

* التدرج من صعب الإزالة (+) إلى سهل الإزالة جدا (++++++).

** ٢٠ ٪ حجم/حجم من المحلول التجارى.

مواصفات مواد التعقيم

يجب أن تتوفر فى مواد التعقيم سـهولة التخلص من آثارها بالشـطف فى الماء. وأن تكـون غير قابلة للتفاعل مع مكونات النسـيج النباتى حتى لا تتكون مركبات لها تأثير ضار على النموات الجديدة. ويجب أن تتحلل بسـهولة إلى مكونات أقل سمية من المادة الأصلية وسـهولة التخلص منها بالماء. وأثناء تعقيم الأجزاء النباتية

قد يظهر عليها لون بنى نتيجة تكوين صبغة الميلانين. ويمكن منع هذه العملية بغمس الأجزاء النباتية فى محلول حمض أسكوربيك تركيز ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ثم غمسها فى حمض الستريك تركيز ١٥٠ ملليجرام/ لتر.

التلوث الذاتى للأجزاء النباتية

يظهر أحيانا نموات للكائنات الدقيقة فى بعض الأوانى المحتوية على مزروعات. وقد يرجع ذلك إلى رداءة التعقيم. وقد يكون مصدر التلوث هى الأنسجة الداخلية للجزء النباتى نفسه التى يصعب على مواد التعقيم الوصول إليها. وتظهر النموات الميكروبية إذا تلامست الأسطح المجروحة على الجزء النباتى للبيئة الغذائية. وتظهر النموات المصابة ضعيفة وشاحبة وتموت، و يجب التخلص من هذه الأوانى فورا. وتساعد البيئة الغذائية الغنية على زيادة انتشار الإصابة الميكروبية. وقد تحدث طفرات ميكروبية قادرة على النمو على البيئة الفقيرة. وقد تكون القمة النامية للساق مصدرا للتلوث لصعوبة تخلل مواد التعقيم بين الأوراق المتجمعة والملاصقة لها. لذلك تعقم القمة النامية على مراحل متتالية تبدأ بغسلها جيدا بالماء ثم تعقم ظاهريا، ثم تزال بعض الأوراق وتعقم مرة ثانية. ويكرر التعقيم بعد كل إزالة لبعض الأوراق. ويفضل أحيانا إجراء اختبار لتقدير كفاءة التعقيم. حيث تحضر بيئة يضاف إليها ٢- ٣٪ تريبتون Tryptone أو بيبتون Peptone. ثم تزرع عليها أجزاء من الطرف القمى لأحد الأفرع بعد قطعها طوليا ويكون السطح المجروح ملامسا للبيئة. وبعد أيام قليلة تظهر بوضوح نموات للكائنات الدقيقة إن وجدت. ونتائج هذه الطريقة غير مشجعة دائما حيث لا توجد بيئة غذائية قياسية يمكن استخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التى تنمو داخل الأنسجة النباتية. ويساعد على ظهور التلوث الذاتى مايلى:

١-عدم غسل وتعقيم الأيدى. وعدم استخدام أقنعة للفم والأنف وأغطية للشعر وقفازات معقمة. وعدم استخدام بلاطٍ معقمة. وعدم السماح بدخول أعداد كبيرة من

الزائرين داخل حجرة الحقن. والتعقيم الردىء لكابينة الحقن. وعدم تغطية الأحذية بغطاء بلاستيك أو غمس نعل الحذاء فى محلول معقم عند دخول حجرة الحقن. لذلك يجب التأكد من سلامة وتعقيم حجرة الزراعة وكابينة الحقن بدفع هواء معقم داخل الكابينة والتشعيع بأشعة (UV) أثناء الليل وتجديد الفلاتر الأمامية للكابينة سنويا.

٢- عـدم تعقيـم منضدة العمل بكحـول إيثانول ٩٦٪. وعـدم تعقيم الأرضيات. والتعقيم الردىء للأدوات المستخدمة.

٣- قد تكون الأسطح الخارجية للأنابيب والدوارق المخروطية غير معقمة جيدا، لذلـك يفضل تعقيمها ثم تخزينها فى ظروف معقمـة حتى ولو كانت محتوية على بيئة غذائية.

٥- وجود بعض الكائنات الحية مثل العناكب، حيث إن لها القدرة على النفاذ بسهولة خلال الأغطية القطنية وشرائط البلاستيك حاملة معها الكائنات الدقيقة إلى البيئة الغذائية فى الأنابيب والدوارق.

طرق التغلب على التلوث الذاتى

١- زراعة الطرف المرستيمى Meristemic tip

يفضل استخدام القمة المرسـتيمية المحاطة بواحدة أو اثنين من منشئات الأوراق لخلوها من الفيروس. وقد يرجع ذلك إلى عدم اكتمال تكوين الأوعية الناقلة فى القمة المرسـتيمية . ويفصل المرسـتيم من القمة النامية المعقمة، وقد لايسـتلزم تعقيمها إذا كانت مفصولة من نباتات معملية أو مرباة فى صوبة.

٢- إضافة مضادات حيوية للبيئة الغذائية

تضـاف أحيانا بعض المضادات الحيوية للبيئة الغذائية مثل: Benomyl ; Benolate بتركيـز ١٠ ملليجرام/ لتر لإيقاف نشـاط الكائنات الدقيقة، وقد يسـبب المركب Benomyl بعـض الأضرار لنمو الأجـزاء النباتية وتطورها. لذلـك لا يفضل البعض

إضافة مثل هذه المركبات للبيئة لاحتمال تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية وتكوين مركبات سامة للنموات، وقد يكون لها ضرر مباشر للريبوسومات مما يؤدى إلى تثبيط النمــو. وقد تظهر طفـرات فى الكائنات الدقيقة مقاومة للمضادات الحيوية، كما أن المضادات الحيوية ليس لها تأثير على الفيروسات. ومن المركبات المستعملة:

Oxytetracycline; Tetracyclin; Penicilin – G; Streptomycin; Rifampicin; Achromycin; Chloromycin; Gentamycin; 8-Hydroxy – **quinoline**



الباب الثالث

زراعة الأنسجة النباتية

تتكاثر النباتات بطريقتين، الأولى وهى طريقة جنسية Sexual وتستخدم فيها البذور. وهى طريقة شائعة فى محاصيل كثيرة. ويؤدى التكاثر بالبذور إلى إنتاج نباتات مختلفة فى صفاتها عن الآباء. وتزداد الاختلافات بارتفاع نسبة التلقيح الخلطى. والطريقة الثانية هى التكاثر الخضرى اللاجنسى Asexual. وهى طريقة تقليدية تستخدم فيها أى جزء آخر خلاف البذور مثل الخلفات والفسائل والعقل والأبصال والدرنات والكورمات وغيرها. ويستخدم التكاثر الخضرى فى إكثار كثير من محاصيل الفاكهة ونباتات الزينة وأشجار وشجيرات وبعض نباتات الخضر وبعض محاصيل الحقل. ويؤدى التكاثر الخضرى إلى تكوين نباتات متجانسة ومشابهة لنبات الأم.

الكفاءة الذاتية للخلية النباتية Cellular totipotency

تطبق زراعة الأنسجة انطلاقا من الحقيقة العلمية بأن للخلية النباتية قدرة ذاتية على الانقسام والتناسخ والنمو وإنتاج نبات كامل له نفس مواصفات نبات الأم، بصرف النظر عن مصدرها من النبات، وهذا ما يسمى بالجهد الذاتى وتحتوى الخلية النباتية الحية على نسخة كاملة من الجينات الموجودة فى أى خلية جسمية أخرى من خلايا نبات الأم. وجميع هذه الجينات ساكنة غير معبرة Unexpressed (Turned-off) ماعدا بعض الجينات المعبرة عن نشاطها فى العضو النباتى الموجودة فيه. لذلك يمكن فصل خلية أو نسيج أو جزء من أى عضو نباتى ثم تزرع على بيئة غذائية مناسبة فتنمو وتنتج نباتا كاملا. كما تتميز أية خلية بوجودها تحت تأثير ما يعرف بالتأثير الوضعى Position effect. فالخلية اللحائية لا يمكن أن تتحول

إلى خلية برانشــيمية بمحــض إرادتها طالما لم تتعرض إلى مــا يجبرها على تغيير تخصصها أو إلغائه. ويعنى ذلك أن الخلية النباتية وهى مازالت ضمن نسيج نباتى معــين لا يظهر لها إلا وظيفة فســيولوجية محددة ، ويعرف هذا بالتأثير الوضعى Position effect. فإذا فصلت خلية حية نشــطة فسيولوجيا من النسيج وأصبحت حرة بعيدة عن التأثير الوضعى السابق وزرعت فى بيئة غذائية مناسبة فإنها تنشط وتقــوم بجميع العمليات الحيوية وتنتــج نباتا جديدا بصرف النظر عن مصدر هذه الخلية. وخاصيــة الجهد الذاتى تميزت بها الخلية النباتية فقط. فلا يمكن فصل خليــة حيوانية أو نســيج حيوانى وزراعته فى بيئة غذائيــة داخل المعمل لإنتاج حيــوان كامل كما يحدث فى النبــات. ومن هنا كان الاهتمام بتطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية (White, 1963; Yamada and Hashimoto, 1988)

أهداف زراعة الأنسجة النباتية

١- إكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور

زراعة الأنسجة النباتية وسيلة لإكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور لعدم قدرتهــا على تكوين بذور أو تنتج بذورا بكميــات قليلة جدا أو بذور تفقد حيويتها بسرعة أو نسبة التلقيح الخلطى مرتفعة مما يؤدى إلى إنتاج نسل غير متجانس وراثيا Heterogeneous progeny.

٢- الإكثار السريع للشتلات Rapid multiplication

تســتخدم زراعة الأنســجة فى الإكثــار التجارى للنباتات لمــا تتميز به من صغر حجم الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار، وصغر المساحة المطلوبة للزراعة، وسهولة توفــير كل من البيئة الغذائية والمناخية المناســبة، وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات فــى فترة قصيرة على مدار الســنة دون التقيد بالموســم الزراعى. ففى خلال ســنة واحدة وباستخدام جزء نباتى واحد تم الحصول على ٤ ملايين نبات أوركيد جنس

سيمبيديم Cymbidium و٣٠٠ ألف نبات اسبرجس Asparagus. كما وجد أن إنتاج ١٠ آلاف نبات قرنفل قابلة للتسويق بالزراعة التقليدية تحتاج إلى توفير ٦٦٧ نباتا في مســاحة ١٧ مترا مربعا. بينما إنتاج نفس العدد من نباتات القرنفل فى الزراعة المعملية يكفى تدبير ٣ نباتات فقط تشغل ٠,٠٨ متر مربع (Morel, 1960).

٣- إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية

بزراعة المرســتيم الطرفــى يمكن إنتاج نباتــات خالية من الأمراض الفيروســية والبكتيرية والفطرية. وتطبق المعاملة الحرارية للمساعدة على التخلص من الفيروسات. وقــد نجحــت الزراعة المعملية فى إنتــاج نباتات بطاطس وطماطــم وفراولة وقرنفل وغيرها خالية من الفيروس.

٤- إنتــاج نباتات أحادية العــدد الكروموســومى Production of haploid plants

هى نباتات عقيمة لا تنتج بذورا، وتحتوى على نصف العدد الكروموسومى (n). بينمــا النباتات الثنائية خصبة وقادرة على تكوين بــذور. وتنتج النباتات الأحادية بالزراعــة المعملية للمتوك أو حبوب اللقــاح أو البيضة. ثم تعامل النباتات الأحادية بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى والحصول على نباتات ثنائية نقية خصبة متجانســة، بدون الدخول فى عمليات التلقيح الذاتى لعدة ســنوات للحصول على سلالات نقية. ولهذه الطريقة أهمية كبيرة فى مجال تربية وتحسين النباتات وإنتاج نباتات محورة وراثيا (Wang, et al., 1973; Wenzel and Uhrig, 1981).

٥- إنتاج هجن بدمج البروتوبلاست Protoplast fusion

باندماج بروتوبلاســت خليتين مختلفتين يتكون بروتوبلاســت هجين فى خلية واحدة، فإذا زرعت خلية البروتوبلاســت المندمج (الهجين) فى المعمل ينتج نبات يحتوى على مجموعتين من الكروموسومات إحداهما قادم من الأم والثانية من الأب

بصـرف النظر عن وجود توافق أو عدم توافق بينهما. والنباتات الناتجة من الزراعة المعملية لها صفات وراثية مختلفة عن صفات الأب والأم كل على حدة.

٦- استحداث الطفرات Mutation induction

تحدث طفرات بنسبة عالية وبصورة تلقائية أثناء الزراعة الثانوية للكالس. كذلك يمكـن الحصول علـى طفرات بمعاملة النباتـات المعملية أو أجـزاء منها بمطفرات كيميائية أو بأشـعة جاما أو أشـعة– X، ثم زراعتها على بيئة مناسـبة وانتخاب مـا يحدث من تغييرات وراثية مناسـبة. وتثبت الصفـة المنتخبة من خلال الزراعة المعمليـة المتكررة. ثـم متابعتها بعد زراعتها فى الحقل لعـدة أجيال مع الانتخاب المستمر للنباتات الحاملة للصفة المطلوبة.

٧- المحافظة على الأصول الوراثية

تحفـظ الأصول الوراثية فى بنوك خاصـة لحمايتها من التدهور أو الاندثار. ويتم ذلك بطرق مختلفة لمنع نموها والمحافظة على حيويتها لفترة طويلة. وتسـهل طرق حفـظ الأصول الوراثية تبادل الأصول الوراثية و تصدير الأصناف التجارية بتكاليف منخفضة جدا.

٨- تحديث وإكثار الأشجار والشجيرات الخشبية

بزراعة الأنسجة يمكن تحديث عمر الأشجار المعمرة وإنتاج كميات كبيرة من الشتلات، كما أن لها أهميتها بالنسبة للأشجار والشجيرات التى يصعب إكثارها خضريا.

٩- إنتاج مركبات ثانوية

ومن أمثلة ذلك استخدام زراعة الخلايا فى إنتاج الكابسيسين Capsaicin من ثمار الفلفل Capsicum frutescens، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا Datura innoxia. حيث تزرع خلايا النبات فى مخمر Fermenter يحتوى على بيئة غذائية

مناسبة لزيادة عددها بكمية كبيرة. ثم تنقل إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة إنتاج Production medium ثم تستخلص المادة الفعالة منها.

١٠- الإخصاب المعملى

يجرى الإخصاب المعملى للتغلب على بعض الظواهر الطبيعية التى تعوق تكاثر النباتات بطريقة طبيعية مثل ظاهرة العقم الأندوسبيرمى ومشاكل التهجينات الجنسية وعدم التوافق وفشل حبوب اللقاح فى الإنبات.

عوامل إنجاح زراعة الأنسجة

يجب توفير مهارات فنية وأجهزة ومعدات خاصة. وأن يكون معدل إنتاج معمل زراعة الأنسجة متمشيا مع احتياج الأسواق المحلية والخارجية لكى تنخفض تكاليف الإنتاج. كما يجب تحديد خطوط الإنتاج والنوع النباتى المطلوب إنتاجه. واختيار الطريقة المناسبة لإكثاره فى المعمل. والاستفادة من ظاهرة عدم الثبات الوراثى فى مرحلة إنتاج الكالس لاستحداث طفرات جديدة. وهى خاصية تهم مربى النباتات واستحداث الطفرات.

مراحل الزراعة المعملية Propagation stages

قسم Murashige, (1961, 1964, 1974) خطوات زراعة الأنسجة النباتية إلى:

١- مرحلة إنتاج نباتات الأم Mother plants.

٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية Isolation of explants من نباتات الأم.

٣- مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explants culture.

٤- مرحلة الزراعة الثانوية Subculture لإكثار الكالس أو النبتات.

٥- مرحلة أقلمة النباتات Hardening والزراعة فى التربة.

١- مرحلة إنتاج نباتات الأم

١- نباتات الأم هى نباتات مرجعية وهى المصدر الآمن لفصل أجزاء نباتية تستخدم فى الزراعة المعملية. ولتحديث نباتات الأم تفصل عقل منها بطول ١٥- ٢٠سم. ثم تجزأ العقل إلى أجزاء (Micro-stocks; Explants) لاستخدامها فى الزراعة المعملية. والأجزاء المفصولة من نباتات حديثة العمر تنتج نموات متجانسة فى المعمل وبنسبة نجاح أعلى، وتنتج جذورا عرضية أكثر، ونموها أفضل من الأجزاء المفصولة من نباتات بالغة.

٢- فى الزراعة التجارية التى تلجأ غالبا إلى النباتات النامية فى الحقل، وهى نباتات عادة تكون شديدة التلوث لتعرضها الدائم للأتربة والآفات الناقلة للأمراض وتحتاج إلى تعقيم يتناسب مع شدة تلوثها. لذلك يجب اختيار أفضل النباتات من حيث قوة النمو وتجانسها وراثيا فى صفاتها من حيث سرعة النمو والتبكير فى النضج وإنتاج الأزهار ولونها وجودة ثمارها .

٣- استبعاد النباتات التى كانت مصابة بأمراض فيروسية وفطرية وبكتيرية ومسببات نقل العدوى مثل الحشرات الثاقبة الماصة مثل المن والعنكبوت الأحمر والذبابة البيضاء. و استبعاد النباتات التى تعرضت لضغوط بيئية أثناء نموها مثل البرودة الشديدة والجفاف الشديد وقصر الفترة الضوئية وعدم انتظام شدة الضوء. وتؤدى شدة البرودة إلى انكسار طور السكون وظهور أمراض البرودة ويؤدى الجفاف وعدم وفرة الضوء إلى ضعف النمو.

احتياج نباتات الأم.

- **الحالة الغذائية** Stock plant nutrition

من المتوقع أن يتأثر محتوى الأجزاء النباتية بالمعاملات السابقة التى تطبق على نباتات الأم. وأن المحتوى الداخلى من الهرمونات والعناصر الغذائية فى الأجزاء

النباتيـة هو امتـداد لما يحتويه نبـات الأم. لذلك يجب اختيـار نباتات أم جيدة النمو. وأن تكون خالية من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسـية. ويفضل أن تكون مـن إنتاج معمل زراعة الأنسـجة، وتربى فى حجـرة النمو أو فى صوبة محمية من الآفـات الناقلة للأمراض، مع توفير رعاية منتظمـة ومنضبطة من الناحية الغذائية والبيئية. ويراعى خفض الرطوبة النسبية فى الصوبة بقدر الإمكان، وأن يكون الرى بالتنقيط أو بالانتشار تحت سطح التربة بدلا من الرى بالرش لحمايتها من الأمراض. والأجزاء المفصولة من نباتات الأم غالبا لاتحتاج إلى تعقيم.

• الفترة الضوئية Photoperiod

للفـترة الضوئية تأثير فسـيولوجى كبـير على بعض الأنواع النباتية المسـتخدمة كأمهات. وتحتاج نباتات الأم غالبا من ١٢ إلى ١٦ ساعة يوميا. وتؤدى إطالة الفترة الضوئية إلى اسـتمرار التمثيل الضوئى وتنشـيط نمو الأجزاء النباتية المفصولة منها. وتقصير الفترة الضوئية يؤدى إلى ضعف نباتات الأم.

وللكثافـة الضوئية Light intensity تأثير هام على نمو النباتات المعملية. فتحتاج كثـير من الأنواع النباتيـة إلى ٤٠٠٠ لكس لكى ترتفع حيويتها. وقد يحتاج البعض الآخر إلى شـدة إضاءة منخفضة. ولذلك يوصـى بتعريض نباتات الأزاليا الأم لكثافة ضوئيـة متوسـطة 10MM/ m² للحصـول على أفضل نموات خضرية تسـتخدم فى الزراعة المعملية. وقد يرجع ذلك إلى أن شـدة الضوء المرتفعة تسبب فقد الأكسينات الداخلية Endogenous auxin التى لها دور هام فى تكوين الجذور.

ويعتقد أن الضوء الأحمر Red light له علاقة بانخفاض الأكسين وزيادة السيتوكاينين فـى البيئة الغذائية. وأن الأشـعة Near- Ultraviolet لها علاقة بانخفاض محتوى الأكسين. ويفسر ذلك نشاط تكوين نموات خضرية من أجزاء نباتية مختلفة. ولوحظ أن زراعـة القمـم النامية المفصولـة من أفرع كانت مظللة لسـتة أصناف من أمهات العنب أنتجت عددا أكبر من الأفرع المعملية بالمقارنة بالمفصولة من أفرع نامية فى جو مشـمس بصورة كاملة. ويفسر ذلك بأن النباتات المظللة تستقبل ضوءا مرشحا ترتفع

فيــه موجــات الضوء الأحمر الذى له القدرة على إنتاج قدر كبير من الســيتوكاينين الداخلــى Endogenous Cytokinin الذى يحســن نمو النباتات تحت ظروف الضوء المنخفض (Economou, 1982; Economou and Read, 1987).

- **الحـرارة Temperature**

تختلـف النباتات فــى احتياجها من الحرارة المنخفضة أو الحــرارة المرتفعة. لذلك يجــب إنماء نباتات الأم تحت ظروف من الحرارة المناسـبة حتــى تكون مصدرا جيدا للأجــزاء النباتيــة المطلوب زراعتها فى المعمل. فمثلا تعريــض بصيلات نباتات الليلى Lily الأم لفــترات مختلفة من التخزين عنــد ٤°م كان له تأثير إيجابى قوى على عدد ووزن البصيلات الناتجة فى المعمل من زراعة أوراق حرشفية مفصولة من نباتات الأم.

- **منـظمات النمو Growth regulators**

رش نباتات الطماطم الأم بمادة Chlormequat chloride تركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون يــؤدى إلى زيادة واضحة فى نمــو الأجزاء المفصولة منها فى المعمــل. كذلك وجد زيادة فــى نمــو الكالس والنبتات الناتجة من زراعة أجزاء ورقية مفصولة من نباتات Dahlia و Petunia بعد رشها بمادة Diaminozide بتركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون. لذلك يفضل رش نباتات الأم بالسيتوكاينين أو غمس الأجزاء المفصولة منها قبل زراعتها فى محلول منظم للنمو يحتوى على ســكر وبعض الهرمونات مثل BA; GA أو زراعتها فى بيئة ســائلة تحتوى على تركيزات مختلفة من (de Langthe and BA de Bruijne, 1976) .

٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية

فصل وتعقيم الجزء النباتى Explant

يفضل فصل الأجزاء من نباتات معملية مرباة فى حجرة النمو أو فى الصوبة. وبعــد تعقيمها تشــطف عدة مرات فى مــاء مقطر لإزالة آثار مــادة التعقيم، ثم

تجفف سطحيا وترص على ورق ترشيح معقم أو مسطح زجاجى معقم باستخدام ملقط معقم. ويستخدم سلاح شفرة معقم فى التخلص من أى جزء تغير لونه أوعند تجزئة الجزء النباتى إلى أحجام أصغر. وتتم التجزئة تحت ميكروسكوب داخل كابينة الحقن. ويستخدم ثاقب فلين لفصل أقراص من أوراق أو من أنسجة داخلية للدرنات. وقد يستخدم جهاز خاص لتقطيع العينات وفصل أجزاء محددة فى الحجم أو الوزن. ويستخدم ورق ألومنيوم معقم عند وزن الجزء النباتى بعد فصله. و يؤخذ فى الاعتبار الحجم المناسب للجزء النباتى لأهمية ما يحتويه من هرمونات ومواد غذائية. ويجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة لأنها مصدر لانبعاث الإيثلين. أما البذور فيمكن زراعتها مباشرة على بيئة مناسبة بعد تعقيمها وشطفها جيدا. وقد تفصل كل من الأجنة والفلقات لزراعتها على حدة. وقد يفضل غمر أو تعويم الأجزاء النباتية فى محلول سيتوكاينين مناسب لرفع محتواها من السيتوكاينين لما له من أهمية كبيرة فى تكوين النموات الخضرية. وثبت أن معاملة أجزاء ورقية من البيتونيا *Petunia hybride* بالسيتوكاينين قبل زراعتها على بيئة خالية منها يؤدى إلى إنتاج نموات خضرية مساوية أو تزيد عن النموات الناتجة من بيئة مضاف إليها نفس السيتوكاينين. كذلك وجد أن غمس ورقة كاملة فى محلول ٤٠٠ جزء فى المليون بنزايل أدينين (BA)، ثم زراعة أجزاء مفصولة منها فى بيئة خالية من السيتوكاينين كان لها تأثير إيجابى كبير فى إنتاج نموات جيدة.

٣– مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explant culture

يزرع الجزء النباتى المعقم فى تماس مع البيئة الغذائية المناسبة إما قطبيا Polar أى قائما Straight up، بحيث تكون القمة متجهة إلى أعلى والقاعدة الفسيولوجية منغمسة فى البيئة، وإما غير قطبى Apolar أى مقلوبا Upside down بحيث تكون القاعدة الفسيولوجية بعيدة عن البيئة وتكون القمة منغمسة فيها. ويفضل زراعة نباتات العائلة

Amaryllidaceae فـى المعمل بطريقة قطبيـة لأنها تعطى جذورا عرضية أفضل، بينما يفضل البعض الزراعة بطريقة غير قطبية لتسـهيل نمو الجذور والسوق وتيسير الإمداد بالأكسيجين وعدم ظهور آثار ضارة ناتجة عن مواد سامة يفرزها الجزء النباتى (Pierik and Steegmans, 1975). وزيـادة الأسـطح المجروحة تسـاعد على زيادة امتصاص العناصر ومنظمات النمو من البيئة، إلا إنها تؤدى فى نفس الوقت إلى زيادة انطلاق غاز الإيثلين الضار. لذلك يجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة بقدر الإمكان على الجزء النباتىحتى لا تكون سببا فى فشل نموه. ويفضل إزالة طبقة الأوعية الإسكلارنشيمية من الجزء النباتى حتى لا تكون عائقا لتكوين الجذور.

الأجزاء المستخدمة فى الزراعة المعملية

- **كالس** Callus

إنتاج الكالس وسـيلة سـريعة للحصول على أعداد كبيرة من النبتات Plantlets. وتنجـح هذه الطريقة مـع بعض الأنواع النباتية دون غيرها. وهى طريقة مسـتحبة على المسـتوى التجارى وعند مربـى نباتات الزينة واسـتحداث الطفرات. ويظهر عـن الكالـس طفرات ذاتية كثـيرة إذا كانت البيئة تحتوى علـى تركيز مرتفع من السيتوكاينين. وتحدث الطفرات فى خلايا الكالس نتيجة التضاعف أو التوزيع غير المنتظم للكروموسومات.

- **بادرات معملية** Plantlets **كاملة أو مجزأة**

يمكـن الحصول على بادرات كاملة بزراعة بذور معقمة على بيئة مناسـبة. وقد تفصـل البـادرات وتهذب بإزالة الأوراق والجذور وتجـزأ إلى عقل وحيدة البرعم ثم تـزرع هذه العقل فى بيئة مماثلة لإنتاج نباتات كاملة. وقد تفصل أجزاء من الأوراق أو الجذور أو الأزهار وتزرع فى المعمل لإنتاج كالس يتكشف بعد ذلك إلى بادرات.

● أجنة Embryos

تزرع الأجنة فى بيئة غذائية بعد فصلها من البذور واستبعاد القصرة والفلقات. وقد تفصل السويقة الجنينية من الجنين لزراعتها فى المعمل.

● نسيج مرستيمى Meristemic tissue

هى طريقة مفضلة بالرغم من انخفاض نسبة نجاحها بالمقارنة بزراعة البراعم، ولكنها الطريقة الرئيسية لإنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. ويحتوى المرستيم على خلايا سريعة الانقسام. ويفصل المرستيم من طرف القمة النامية للفرع بعد استبعاد جميع الأوراق المحيطة بها ماعدا ١- ٢ من منشئات الأوراق، ثم يزرع المرستيم بعد فصله مباشرة فى بيئة غذائية صلبة. ويتم فصل المرستيم وزراعته داخل الكابينة المعقمة. والقمة المرستيمية الصغرى فرصتها أكبر للحصول على نباتات خالية من الفيروس.

● براعم طرفية وجانبية Auxiliary and Terminal bud

تزرع البراعم الطرفية والجانبية على الساق الرئيسى والأفرع الجانبية فى بيئة غذائية مناسبة لتحفيزها على النمو. ويجب اختيار البراعم المحتوية على بعض الأوراق الأولية، وألا تكون البراعم فى حالة سكون. ويتم اختيار الأفرع حديثة العمر قوية النمو، ويفضل نقعها فى الماء قبل فصل البراعم منها.

● متوك وحبوب لقاح Anther and Pollen grains

تزرع المتوك وحبوب اللقاح بهدف إنتاج نباتات أحادية Haploid تحتوى على نصف العدد الكروموسومى للخلية الجسمية. ثم تعامل النباتات الأحادية الناتجة بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى بها وإنتاج نباتات ثنائية متجانسة.

• خلية واحدة Single cell

يتم تفكيك خلايا نسيج أو كالس فى بيئة سائلة ميكانيكيا أو إنزيميا. ثم تلقط خلية واحــدة من معلق الخلايا المتكون بماصة ميكرومترية، ثم تزرع منفردة فى بيئة ســائلة أو بيئة صلبة تحتوى على آجار، فتتحول الخلية بسهولة إلى جنين جسمى Somatic embryo قادر على التكشف إلى نبات كامل. والنباتات الناتجة تكون مطابقة لمواصفات الأم Cell line وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع عديد من النباتات الراقية.

• بروتوبلاست Protoplast

يتميز البروتوبلاست بقدرته على الاندماج والتكتل. ويستفاد من هذه الظاهرة فى دمج بروتوبلاست لخليتين من الخلايا الجسمية. ويستلزم لذلك هضم الجدر الخلوية للخليتين بفعل الإنزيمات لإطلاق البروتوبلاست منهما واندماجهما، ثم إعادة تكوين الجدار الخلوى للخلية الهجينية الجديدة. وبزراعة الخلية الهجين فى بيئة غذائية مناسبة يتكون جنين جسمى ينمو ويكون نموات خضرية وجذرية.

الزراعة فى الأنابيب والدوارق المخروطية

تمســك الأنابيــب والدوارق المخروطية المحتوية علــى بيئة محتوية على آجار فى وضع أفقي. ويقلل هذا الوضع التلوث بشـدة خصوصا إذا كانت الزراعة خارج الكابينــة المعقمــة. ويجب تجنب تعريض فوهة الأنابيــب أو الدوارق إلى اللهب إذا كانــت الزراعة داخل الكابينــة حتى لايؤدى إلى إنتاج الإيثلــين وتجمعه داخلها. وتحتاج زراعة البذور أو الأنســجة المرســتيمية إلى تثبيتها على سطح البيئة الصلبة بالضغط عليها برفق باستخدام إبرة الحقن أو ما يماثلها. لأن غمس البذرة أو النسيج بالكامل فى البيئة يعرضهما إلى نقص الأكســجين. بينما بالنســبة للبراعم أو أجزاء مــن النخــاع أو أى جزء آخر فيغمس نصفها تقريبــا فى الآجار حتى لا يتعرض إلى نقــص الأكســيجين. ويراعى المحافظة على قطبية الجــزء النباتى عند زراعته، إن

كان قائمــا Straight up (Polar) أو مقلوبا .Upside down (Apolar) وهذا يتوقف على نــوع النبات. فتتكون الجــذور العرضية على المنطقة القاعدية للجزء النباتى إذا زرع قائما. وإذا كان الجزء النباتى مفصولا من نبات مفترش غير قائم فيفضل زراعته فى وضع أفقى على البيئة الغذائية، وقد تتكون الجذور العرضية بصورة أفضل فى بعض النباتات إذا زرع الجزء النباتى مقلوبا.

العوامل المؤثرة على نمو الجزء النباتى فى المعمل

(أ) عوامل خاصة بالجزء النباتى

• تجانس وحجم الجزء النباتى

يجب أن تكون الأجزاء النباتية متجانسة فى خلاياها، ويؤدى عدم التجانس إلى تكوين كالس غير متجانس الخلايا، والنموات الناتجة منه تكون غير متجانسة فى النمو والتركيب الوراثى. كذلك يؤثر حجم وشكل الجزء النباتى على نموه. فقد يفشل فى النمو إذا قل حجمه عن القدر المناسب، وإذا كبر حجمه يكون له قدر كبير فى النجاح والنمو. وقد يرجع ذلك إلى احتوائه على كمية أكبر من المواد الغذائية وعدد أكــبر من الخلايا مما يزيد من إنتاج نموات كثيرة. لذلك يفضل تحديد حجم الجزء النباتى وشــكله وتركيبــه فمثلا الأجزاء المفصولة من مناطــق التخزين فى البطاطس والبطاطا واللفت والجزر وغيرها فيفضل فصل جزء أســطوانى منها بأبعاد 2.4 x 20 ملليمتر لأن الشــكل الأســطوانى يتيح فرصة أفضل لامتصاص العناصر الغذائية من البيئة وتبادل الغازات. كما أن لمنظمات النمو والعناصر الغذائية المفرزة من الأســطح المجروحة بالجزء النباتى لها دور فعال فى تنشيط الانقسام وتكوين الكالس. ويوصى بأن الحد الأدنى لوزن القطعة من جذر الجزر هو ٣,٨ ملليجرام حيث يحتوى على ٢٥ ألــف خلية تقريبا. بينما نفس الكتلة من درنات الخرشــوف تحتوى على عدد أقل من الخلايا نظرا لكبر حجمها. ولذلك يوصى بأن تكون كتلة القطعة من درنات

الخرشوف ٨ ملليجرام حيث تحتوى على ٢٠ ألف خلية تقريبا. وأن يفصل الطرف المرستيمى من القمة النامية لنباتات البطاطس أصغر من ذلك لضمان إنتاج نباتات خالية من الفيروس.

● النمط الوراثى للنبات Genotype

تختلف قدرة النباتات على النمو والتكاثر المعملى باختلاف نوعها وتركيبها الوراثى. فمن الثابت صعوبة تكوين الجذور العرضية على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe farinaceae* إذا زرعت فى الحقل، بينما يسهل ذلك بزراعتها فى بيئة غذائية مناسبة فى المعمل. وعموما يسهل تكاثر النباتات ثنائية الفلقات Di-cotyledons فى المعمل عن النباتات أحادية الفلقات Monocotyledons. والنباتات التى تتكاثر خضريا بسهولة فى الحقل يسهل تكاثرها فى المعمل. كما أن بعض العائلات والأجناس النباتية لها قدرة عالية على التكاثر مثل العائلة *Solana-cea* ومنها الأجناس *Petunia; Datura; Lycopersicon; Nicotiana; Solanum*؛ والعائلة *Cruciferae* ويتبعها الأجناس *Arabidopsis; Brassica Lunnaria;*. والعائلة *Gesneriaceae* ويتبعها الأجناس *Streptocarpus Achimenes; Saintpaulia*؛ والعائلة *Compositae* ومنها الأجناس *Chrysanthemum; Chichorium Lactuca;* والعائلة *Liliaceae* ومنها الأجناس *Lil (George, 1993) ium; Ornithogalum; Haworthia; Allium*.

● العمر الفسيولوجى Physiological age

الأنسجة الجنينية والأنسجة الحديثة Juvenile أكثر قابلية للنمو والتكوين الشكلى Morphogenesis عند زراعتها معمليا بالمقارنة بالأنسجة المتقدمة فى العمر Adult. وتنخفض قدرة الأشجار والشجيرات على التكاثر المعملى بتقدمها فى العمر، لذلك يجب إنتاج نباتات حديثة منها. ويفضل للزراعة المعملية استخدام

أجزاء نباتية حديثة العمر مثل الأنســجة المرستيمية والبادرات الحديثة. وتختلف بعــض الأنــواع النباتية فى هذا المضمون العام مثــل *Anthurium andreanum Lunaria annua; Hedera helix;*. كما أن الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات يســهل تكاثرهــا خضريا تكون أفضل للزراعة المعملية عن الأجــزاء المفصولة من نباتات لا تتكاثر خضريا. كذلك البراعم الســاكنة والبذور الساكنة تكون أصعـب فى النمو فى المعمل بالمقارنة بغيرها غير الساكنة. وقد تزداد قدرة النمو والتكاثر للأجزاء النباتية المفصولــة أثناء فترة تزهير بعض النباتات بصرف النظر عن عمرها مثل *Ranunculus seeleratus; Freesia; Launaria*. وعموما تظل القمم النامية المفصولة من ســوق حديثــة العمر هى الأفضل فى الزراعة المعملية لأنها نشــطة وقادرة على الانقســام والتكاثــر بالمقارنة بالقمم النامية المفصولة من ســوق متقدمــة العمر. بالرغم من ذلك تنجح زراعة القمم النامية والأنسجة المرستيمية المفصولة من سوق متقدمة فى العمر لبعض النباتات مثل:

Rhododendron hybrids; Sequoia sempervirens; Malus sylvestris; Pinus pinaster; Cryptomeria japonica; Vitis vinifera; Thuja occidentalis.

(ب) عوامل خاصة بالبيئة المحيطة

• **طول الفترة الضوئية Photoperiod**

المرحلــة الأولى لنمو الأجــزاء النباتية لأنواع كثيرة من النباتات لا تتأثر إن كانت فــى ضــوء أو ظلام. بينما فى مراحل النمو التالية يكــون من الضرورى تتابع فترتى الضــوء والظلام لتكوين نموات خضرية وجذور. وكان ذلك مؤكدا بالنســبة للنموات الناتجة من زراعة براعم زهرية حديثة للفريزيا Freesia. وقد يســتلزم وجود الضوء لإنبات بعض أنواع البذور، بينما يســتلزم وجود الظــلام لإنبات بذور أنواع أخرى مثــل الأوركيــد Orchid (Pierik and Steegmans, 1975). وتؤثر طول الفترة الضوئية على نمو الأجزاء النباتية وتكوين النبتات فى المعمل. ويختلف هذا التأثير باختلاف

نوع النبات. وتعتبر ١٢ ســاعة ضوءا هى الأفضل لنشــوء وتكوين نموات على أجزاء مفصولة من درنات نبات Helianthus. وأن ١٥- ١٦ ساعة ضوءا هى الأفضل لتكوين أجنــة على كالس نبات Geranium، بينمــا تنخفض عدد الأجنة المتكونة بإطالة أو تقصير الفترة الضوئية عن ذلك. ويتغير لون الكالس إلى اللون الأخضر ولا تتكون منه أجنــة إذا كان ناميــا فى ظلام تام. بينما لم يتأثر تكويــن النموات الجديدة بزراعة المرســتيم القمى لنبات Pharbitis nil تحت ظروف ١٦- ٢٤ ســاعة ضوءا. كما ثبت أن مستوى الأكســجين والسيتوكينين داخل النسيج يتأثر بإطالة الفترة الضوئية فى الأنسجة المرستيمية المفصولة من نباتات تحتاج أصلا إلى فترة ضوئية طويلة.

- **شدة الإضاءة Light intensity**

لم يتم حتى الآن تحديد أفضل شدة إضاءة مناسبة لنمو الأنسجة النباتية المختلفة، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف احتياج النباتات باختلاف مراحل النمو والنوع النباتى، فقد وجد أن ١٠٠٠ لكس Lux هو أفضل شــدة إضاءة فى المرحلة الأولى والثانية من الزراعة الثانوية للأنســجة والخلايا النباتية، وقد تزداد إلى ٣٠٠٠- ١٠٠٠٠ لكس فى المرحلة الثالثة. ويتطلب زيادة شدة الإضاءة بعد نقل النباتات من البيئة الغذائية إلى التربة. ويجب ألا تصل الكثافة الضوئية فى المعمل إلى نفس المستوى السائد فى الحقل أو الحجرة الضوئية (تقدر ما بين ٣٠- ٧٠ وات/ متر مربع)، لأن زيادة شدة الضوء داخل المعمل عن القدر الأمثل والمناسب للزراعة المعملية يسبب أضرارا كثيرة. فقد لوحظ نشــاط نمو الأجزاء النباتية المزروعة فى المعمل عند شــدة إضاءة منخفضة (٨- ١٦ وات/ مــتر مربــع)، وقد يحدث النمو فى المعمل عند شــدة إضاءة أقل من ذلــك. ويفضل اختيار الشــدة الضوئيــة المنخفضة لأن التمثيــل الضوئى فى الأجزاء النباتيــة المزروعة والنموات الحديثــة الناتجة منها يكون ضعيفا لعدم اكتمال تكوين الكلوروفيل، خصوصا إذا انخفض تركيز ثانى أكســيد الكربون فوق الآجار. ويمكن تعويض النقص فى الشــدة الضوئية بإضافة الســكر للبيئة الغذائية، إلا إن الإضافة الزائدة من السكر قد تؤدى إلى ضعف سرعة نمو النباتات فى المعمل.

● طول الموجة الضوئية Wave length

فــى حالة النباتات التىتتأثر بطول الموجــة الضوئية Photomorphogenic plants يتم الســيطرة عليها بإضافة صبغة الفيتوكروم Phytochrome لقدرتها على امتصاص الضــوء بطول موجه (٦٦٠ نانوميتر) وتتحــول إلى صبغة .Phytochrome – red (Pr) فــإذا تعرضت الصبغة (Pr) إلى الأشــعة الحمراء تتحول إلى صبغــة Phytochrome far red (Pfr) التىتســتطيع امتصاص الأشعة بطول (٧٣٠ نانوميتر). ويحدث تحول صبغة الفيتوكروم من (Pr) إلى (Pfr) ببطء فى الظلام وبسرعة عندما تتعرض للأشعة الحمراء البعيدة Far red، وتسيطر صبغة (Pfr) على التكوين النباتى عن طريق تحفيز الجينات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. وفى دراسة على أنسجة نبات التبغ ثبت وجود اختلاف فــى قــدرة كلٍ من الضوء الأحمر والأخضر بالمقارنة بالضــوء الأزرق على تحطيم هرمون انــدول حمض الخليك (IAA) المضاف للبيئة الغذائية، حيث يعمل الضوء الأزرق على تحطيم هذا الهرمون، بينما ليس له تأثير على هرمون نفثالين حمض الخليك (NAA)، ممــا يــؤدى إلى إضعاف النمو. وهذه النتائج لا تماثل نتائــج نباتات الكريزانثم *Chry-santhemum* والداليا Dahlia (Beauchesne, et al., 1970) . ولوحظ أن الضوء الأحمر (٦٦٠ نانوميتر) يشجع على تكوين الجذور العرضية على الأجزاء المفصولة من نبات الطرطزفــة *Helianthus tuberosis* أكثر من الضوء الأزرق. وأن نمو كالس نبات *Pel-argonium* كان أفضــل فى وجــود الضوء الأبيض (يحتوى على جميع ألوان الطيف (Polychromatic)، وكان وجــود الضــوء الأزرق أفضل من الضــوء الأخضر والأحمر أو الإظلام التام. كذلك ثبت أن الضوء الأزرق والبنفســجى ينشــطان تكوين الســوق العرضية من كالس التبغ، بينما يشجع الضوء الأحمر على تكوين الجذور العرضية. وفى مضمون عام ثبت أن الضوء الأبيض عادة يثبط تكوين الجذور العرضية وينشــط تكوين السوق العرضية، بينما فى معظم الحالات ينشط الضوء الأحمر تكوين الجذور العرضية لنبات (*Pseudotsuga menziesii*) ونبات الكرنب Brassica oleracea .

• **مصدر الضوء Light source**

تستعمل لمبات فلورسنت بيضاء باردة عادة لإضاءة معامل زراعة الأنسجة. ويستخدم فى بعض المعامل لمبات فلورسنت قوة ٣٨ وات (38W, Fluorescent-Tubes, Philips, Type 33)، مع أن لمبات الصوديوم قد تعطى نتائج أفضل. وأن تكوين الجذور على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe* كانت أفضل بتعريضها لضوء من لمبات Interna 39 and Warm White de Lux 32، لاحتوائه على ضوء أحمر برتقالى Orange- red light بنسبة أعلى. وأن اللمبات التى ينبعث منها نسبة مرتفعة من الأشعة فوق البنفسجية (UV) كان لها تأثير مثبط على تكوين الجذور العرضية. وثبت أن الضوء المنبعث من لمبة فلورسنت يضعف منذ اللحظة الأولى من بدء تشغيلها، فإذا كانت كمية الضوء المنبعث عند بداية التشغيل ١٠٠٪ فإنها تنخفض لتصبح ٩٣٪ بعد ٨ أيام، ثم تصل إلى ٨٦٪ بعد ٤ أشهر ثم ٧٠٪ بعد ١٢ شهرا. (Norton and Norton, 1986)

• **الحرارة Temperature**

تختلف درجات الحرارة المناسبة لنمو الأجزاء النباتية باختلاف أنواعها. ولذلك يجب تزويد حجرة النمو بجهاز تكييف يعمل ذاتيا لتثبيت درجة الحرارة، وأن تفصل النباتات المتماثلة فى احتياجاتها الحرارية فى حجرة زراعة واحدة. وللحرارة المنخفضة أهمية فى كسر سكون البراعم والبذور وتحسين نموها، لذلك يجب تعريضها وهى فى مرحلة السكون إلى حرارة منخفضة لفترة زمنية حتى ينكسر سكونها ومن هذه النباتات التفاح والكمثرى والعنب والصنوبر *Pine* كما أن اختلاف الحرارة بين النهار (٢٦°م) والليل (١٥°م) وتعاقبهما بصورة مستمرة ومنتظمة يؤدى إلى زيادة عدد الجذور المتكونة على الأجزاء المفصولة من درنات الطرطوفة *Helianthus tuberosus* والجزر Carrot وذلك بالمقارنة بتلك المعرضة لحرارة ثابتة فى النهار والليل. وكان أفضل نمو لها عند ٢٦°م فى النهار و ٢٠°م فى الليل (Skoog,

et al., 1974). ويعتبر المدى ٢٦- ٢٨°م هو أنسب درجات حرارة لنمو معظم الأجزاء النباتية و١٨°م للأنواع المكونة للأبصال والدرنات و٢٨- ٢٩°م للأنواع الاستوائية. وتزرع أغلب الأجزاء المفصولة من أشجار الفاكهة ما بين ٢٣- ٣٢°م ، حيث ينمو كالس أشجار التفاح جيدا عند ٢٠- ٣٢°م، ويكون نموها ضعيفا عند أقل من ٢٠°م. بينما الأجزاء المفصولة من الأفوكادو Avocado تحتفظ بحيويتها عند ٥٥°م. ووجد أن أنسب حرارة لنمو الأجزاء المفصولة من البطاطا *Ipomoea* والنامية فى بيئة سائلة هى ٢٥- ٣٢°م والأجزاء المفصولة من نبات *Rhododendron* والنرجس *Narcissus* هى ٢٥°م، والليليم *Lilium auratum* هى ٢°م.

- الرطوبة Humidity

بالرغم من قلة الدراسات عن تأثير الرطوبة داخل حجرة النمو، إلا إن ارتفاع الرطوبة بها قد يؤدى إلى ارتفاع نسبة التلوث. وزيادة الرطوبة فى البيئة الغذائية المنزرعة تؤدى إلى زيادة تكثيف بخار الماء على الجدار الداخلى لها. مما يؤدى إلى ظهور التزجج Vitrification وهى ظاهرة تؤدى إلى موت الأنسجة المنزرعة فى المعمل. ويمكن التحكم فى هذه الظاهرة بزيادة تركيز الآجار فى البيئة الغذائية.

- الأكسيجين Oxygen

التهوية الجيدة لها أهمية كبيرة لمساعدة الخلايا والأنسجة وغيرها على النمو. ويتم تحقيق ذلك باستخدام ماكينات رج مثل Shaking machines; Orchid wheels تناسب الدوارق المخروطية المحتوية على بيئة سائلة. ولتحسين التهوية فيها تزرع الأجزاء النباتية داخل الدوارق على كبارى ورقية. بينما يمكن تحسين التهوية داخل الأنابيب بتغطيتها بأغطية معدنية فقط ولا تستخدم سدادات قطن صوفى. وتزرع الأجزاء النباتية فيها بطريقة غير قطبية على سطح البيئة الصلبة المحتوية على آجار ولا تغمس فيها.

- **ثانى أكسيد الكربون Carbon dioxide**

يؤدى تجمع ثانىأكسيد الكربون إلى سمية النباتات النامية داخل أوانى الزراعة المعمليــة خاصــة إذا كانت محكمة الغلــق. لذلك يجب التخلص من ثانى أكســيد الكربــون الزائد فى الأوانــى المزروعة لتجنب حدوث الضــرر للنباتات، مع إضافة السكروز للبيئة كمصدر هام للكربون.

- **غاز الإيثلين Ethylene gas**

استخدام لهب كحولى أو غازى فى تعقيم فوهة الأنابيب أو الدوارق أثناء الزراعة المعمليــة يؤدى إلى زيادة تجمع الإيثلين داخلهــا خصوصا إذا كانت محكمة الغلق. وزيادة الإيثلين تسبب الأضرار الآتية :

- تكوين خلايا نباتية غير متخصصة (كالس) مما يؤدى إلى إعاقة تكوين النبتات أو إنتاج نبتات رخوة وضعيفة.
- انخفــاض تركيــز اللون الأخضر أو عــدم ظهوره فى الأجــزاء النباتية وزيادة محتوى البيئة الغذائية من اندول حمض الخليك (IAA).

(جـ) عوامل خاصة بالبيئة الغذائية

- **تركيب البيئة الغذائية**

جميــع الأجزاء النباتيــة المفصولة من نباتات ذات الفلقتــين أو ذات الفلقة الواحدة قادرة على إنتاج كالس عند زراعتها فى بيئة مناسبة. ويفضل المحافظة على مكونات البيئة المناســبة لــكل مرحلة من مراحل النمــو، وأى تغيير فى تركيــب البيئة حتى ولو كان بســيطا يؤدى إلى إحــداث تغيير كبير فى طبيعة نمو الكالس.

● رقم الحموضة pH- Value

رقم حموضة البيئة عند 5 -6.5 يعتبر مناسـبا لنمو النباتات المعملية، ويفضل ضبطه عند pH6 . ويتغير تماسـك البيئة المضاف إليها الآجار بانخفاض رقم الحموضة عن 5.4 أو ارتفاعها عن 7. ويسبب التعقيم بالأوتوكلاف انخفاض حموضة البيئة بمعدل 0.3 -0.5 وحدة، كذلك رقم حموضة البيئة السائلة قابل للتغيير بعد زراعتها. وقد يرجع ذلك إلى إفرازات الأجزاء النباتية أثناء نموها. كذلك تتأثر حموضة البيئة بسرعة امتصاص عنصر النيتروجـين. لذلك يجب العمل على ثبات رقـم الحموضة بالمحافظة على التوازن بين تركيز النترات والأمونيا فى البيئة الغذائية والانخفاض الشديد للحموضة يؤدى إلى:

– انخفـاض امتصاص الحديد إذا كانت البيئة حامضية (pH 5.4- 4.5). لذلك من الضـرورى جدا رفع رقم الحموضة فى اتجاه نقطة التعادل بإضافة مركب Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA) لضمان توفير عنصر الحديد والعناصر الأخرى.

– يصبح IAA وGA_3 وفيتامين B_1 وحمض البانتوثينيك أقل ثباتا. وتصبح الآجار غير متماسك Sloppy.

– ترسـيب لبعض الأملاح مثل الفوسـفات والحديد وينخفض امتصاص أيونات الأمونيا ويتوقف النمو.

– سـهولة تحلل السكريات أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف. إلى جلوكوز وفركتوز ويتحـول الجلوكـوز جزئيا إلى فركتوز بعد التعقيـم بالأوتوكلاف إذا كانت حموضة البيئة (pH 6).

● الجهد الأسموزى Osmotic potential

تؤثـر عوامـل كثيرة على الجهد الأسـموزى للبيئة الغذائية مثـل تركيز الآجار والعناصر المعدنية والوزن الجزيئى للأملاح المعدنية وسهولة تأينها. وللسكروز تأثير نسـبى فى زيادة الجهد الأسموزى، والسـكروز هو سكر ثنائى يتحلل أثناء التعقيم بالأوتـوكلاف إلى وحدتين من السـكر الأحادى مما يكون سـببا فـى رفع الجهد الأسموزى للبيئة. وللأملاح المعدنية الكبرى تأثير أكبر. ويختلف الجهد الأسموزى

كثـيرا باختلاف محـتوى البيئة من الســكريات والأملاح. ويقدر الجهد الأسموزى بوحدة البار Bar أو الباســكال Pascal (البار = 10^5 باســكال). وأظهر Pierik and Steegmans, 1975 أن زيادة الجهد الأسموزى أكثر من 3×10^5 باسكال (= 3 بار) يــؤدى إلى توقف النمو نتيجة توقــف امتصاص الماء. ويعتبر مركب المانيتول Mannitol من المركبات المســببة لرفع الجهد الأسموزى للبيئة ومثبط فســيولوجى للنمو. وإضافــة واحد مولر مــن المانيـتول يؤدى إلى جهـد أسموزى يعــادل (22.4 بار) . وحديثا يضاف مركب Polyethylene-glycole لتغيير الجهد الأسموزى للبيئة بدلا من المانيـتول (جدول ١).

- **إفرازات الجزء النباتى Explant exudates**

الأجزاء المفصولة من بعض النباتات مثل الأشــجار والشــجيرات الخشــبية تفرز صبغات بنية أو ســوداء من الجروح الموجــودة عليها. وهى مركبات متعددة الفينول Polyphenols وتانينات Tannins ســامة تؤدى إلى توقف النمو فى مزارع الأنســجة. واقترح Anonymous (1978) المعاملات التالية للتغلب على هذه الإفرازات:

– تقليــل الجــروح على الجزء النباتــى أو نقع الأجزاء النباتيــة فى الماء قبل زراعتها فى البيئة الغذائية، وإضافة الفحم النشط (AC) للبيئة بتركيز 0.2 - 3.0٪ (وزن/ حجم).

– إضافــة مركب (PVP) للبيئة الغذائية بتركيز 250 - 1000 ملليجرام/ لتر، وهو بوليمر له القدرة على إدمصاص المركبات الفينولية أو إضافة مركبات مضادة للأكسدة مثل حمض الســتريك وحمض الأســكوربيك والثيوريا والسيسـتين وهى مركبات مانعة لأكسدة الفينولات أو إضافة ثلاثة أحماض أمينية وهى: جلوتامين Glutamine والأرجينين Arginine والأســبرجين Asparagine. كمــا أن تخفيض تركيز الأملاح المعدنية فى البيئة الغذائية يقلل من الجهد الأسموزى وتقل الإفرازات.

– تجديد الزراعة على بيئة ســائلة طازجة يؤدى إلى انتشــار الإفرازات الســامة بصورة مخففة حول الجذور.

وتســاعد منظمات النمو على اســوداد البيئة وأكســدة المركبات الفينولية، وعدم إضافتها يؤدى إلى توقف عمليات الأكسدة. وثبت أن إضافة مركب Diethyl-dithio carbonate (DIECA) فى ماء شطف الأجزاء النباتية بعد تعقيمها بمركبات التعقيم بتركيز ٢ جرام/ لتر أو إضافة قطرات من هذا المركب وقت تقطيع وتهذيب الأجزاء النباتية وقبل زراعتها على البيئة يعمل على إيقاف أكسدة المركبات الفينولية ولوحظ ظهور لون بنى عند قاعدة الأفرع فى مزارع الأنسجة ناتج عن النشاط الضوئى Photo activation ويمكــن تقليل هذه الظاهرة بحفظ قواعد الســوق فى الظلام أثناء نموها، أو يمنع نفاذ الضوء بدهان الجوانب الخارجية للأوانى المزروعة باللون الأسود حتى مســتوى البيئة الغذائية، أو تلف قواعدها بورق ألومنيوم، أو إضافة طبقة رقيقة من الفحم النباتى غير النشط وآجار على سطح البيئة الغذائية.(Rugini, et al., 1986)

جدول (١) الجهد الأسموزى لبعض البيئات الغذائية

البيئة الغذائية	الضغط الاسموزى السكر(بار)	الضغط الاسموزى العناصر الغذائية (بار)
White (1939)	1.46	0.43
Hilderbrandt (1971)	1.46	0.67
Heller (1953)	4.05	0.96
M. S. (1962)	2.20	2.27

٤- مرحلة الزراعة الثانوية (زراعة متكررة)

Sub-culturing

هــى زراعة النبتات Plantlets أو الكالس Callus عــدة مرات متتالية وعلى فترات متقاربة بهدف زيادة عدد النبتات أو زيادة كمية الكالس بما يتناسب مع حاجة العمل.

ويستخدم فى كل مرة نفس البيئة الغذائية ولكنها طازجة. ويفضل عدم تكرار الزراعة الثانوية أكثر من اللازم حتى لا يفقد الجزء النباتى قدرته الذاتية على تكوين النموات. وكان ذلك مؤكدا مع نبات العليق *Convolvulus* وكالس الجزر والقمم النامية لجذور نبات *Isatis tinctoria* حيث تفقد قدرتها على تكوين النموات الجديدة تدريجيا بزيادة عدد مرات الزراعة الثانوية. بينما فى حالات أخرى وجد أن نباتات *Lilium longiflorum* و *Chrysanthemum* وأشجار خشبية كثيرة تزداد قدرتها على تكوين النموات الجديدة بتكرار الزراعة الثانوية التى قد تصل إلى عدة سنوات.

الحاجة إلى إجراء الزراعة الثانوية

١- عندما تصبح البيئة معرضة للجفاف. أو تحولت من صورة صلبة إلى صورة سائلة لزيادة حموضتها.

٢- عندما تملأ النموات الفراغ الداخلى لأوانى الزراعة أو عند الحاجة إلى زيادة عدد النباتات أو كمية الكالس.

٣- عند ظهور لون بنى أو أسود على البيئة نتيجة تجمع مواد تفرزها الأنسجة النباتية خلال الأسابيع القليلة الأولى من الزراعة، وهذه المواد سامة قد تؤدى إلى موت النباتات.

٤- عند الرغبة فى تغيير اتجاه النمو. ويستلزم لذلك إتمام الزراعة الثانوية فى بيئة غذائية جديدة ذات تركيب منشط لنمو الجذور أو السوق ويتم ذلك بتغيير منظمات النمو.

خطوات الزراعة الثانوية

تعقم الأنابيب أو الدوارق المخروطية جيدا من الخارج وعند الفوهة بكحول ٩٦٪، ويفضل تعقيم السدادات تعقيما سطحيا. ثم يستبعد ورق الألومنيوم أو غشاء البوليثين Polythene المستخدم فى تغطية فوهة الأوانى الزراعية. وباستعمال ملقط معقم يستخرج الجزء النباتى أو كتلة الكالس بحذر من الأنبوبة أو الدورق المخروطى

ويوضع فى طبق بترى معقم أو بين ورق ترشيح معقم. وباستخدام مشرط معقم تستبعد الأجزاء المتضررة بالقرح Necrotics ثم يقطع الجزء الباقى إلى أجزاء متجانسة، وتزرع فــى بيئة طازجة. وتجرى جميع هذه الخطوات داخل الكابينة المعقمة. وقد تحدث بعض التغييرات فى التكوين الظاهرى للنباتات أثناء الزراعة الثانوية مثل:

١- انخفاض مستوى منظمات النمو الموجودة طبيعيا فى الجزء النباتى مما يؤدى إلى عدم تكوين نموات جديدة. وتســتعيد الأجزاء النباتية قدرتها على النمو بإضافة الكاينيتين إلى البيئة. وقد تأكد ذلك فى نبات *Isatis tinctoria*.

٢- زيــادة تكــرارات الزراعة الثانوية يــؤدى إلى إنتاج نباتــات مختلفة وراثيا عــن نباتات الأم. وقد يرجع ذلك إلى ســرعة انقســام الخلايا وعــدم انتظام توزيع الكروموســومات أثناء انقسامها. وتؤثر هذه الاختلافات سلبا على الإنتاج التجارى، وإن كانــت لهــا أهمية عند مربــى النبات الذى يبحث عــن الاختلافات الوراثية. ويختلف عدد تكرارات الزراعة الثانوية باختلاف النبات، فزيادة تكرارات الزراعة الثانوية للأشــجار والشجيرات الخشبية يساعد على التخلص من المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية فى البيئة.

٣- لا يفضل إطالة الفترة بين تكرارات الزراعة الثانوية أكثر من ٤- ٦ أســابيع لأنه يؤدى إلى اســتنزاف عناصر البيئة وجفاف البيئة وتشــققها إن كانت صلبة أو زيادة تركيز بعض مكوناتها إن كانت سائلة نتيجة تبخير الماء منها وتراكم المركبات الأيضية الســامة والمثبطة للنمو التى تفرزها الأجــزاء النباتية فى البيئة، وقد تنتقل هــذه المواد الســامة إلى البيئة إذا تم تجديدها. كذلك يــؤدى تأخير الزراعة الثانوية للكالس إلى إضعاف نشــاطه وتلف جزء منــه ولا يفضل زراعة الكالس الضعيف مرة ثانية لأنه يؤدى إلى مزيد من الضعف .

٥- مرحلة أقلمة النباتات والزراعة فى التربة

النباتات المعملية عادة لها أسطح مغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكل نتيجة زيادة الرطوبــة داخل أوانى الزراعة إلى ٩٠- ١٠٠٪، وتكــون الأوراق عادة رقيقة وغضة

وغير قـادرة على التمثيل الضوئـى لانخفاض محتواها من البلاسـتيدات الخضراء النشـطة وزيادة محتواها من البلاسـتيدات غير النشـطة Palissade cells، واحتواء خلايا الميزوفيل على مسافات بينية هوائية كثيرة، والثغور Stomata دائمة الانفتاح وغير قادرة على تأدية وظيفتها الطبيعية، وضعف الأوعية الناقلة التى تربط الجذور بباقى أجـزاء النبات مما يـؤدى إلى ضعف حركة المياه داخل النبات. ومضمون ذلك أن النباتات المعملية هى نباتات ضعيفة لا تسـتطيع الاعتماد على نفسـها فى بناء غذائهـا Heterotrophic. ومن السـهل أن تفقد قدرا كبيرا من محتواها المائى خلال السـاعات الأولى بعد نقلها إلى البيئة الخارجية ممـا يعرضها للجفاف والموت. وقد تنجـح بعض النباتات مثـل *Saintpaulia; Episcia* على تحمل البيئة الجديدة بعد نقلهـا من المعمل إلى الصوبة لقدرتها على اسـتكمال نمو الجذر. وقد لا تنجح أنواع أخرى مثل القرنفل والقنبيط لسـهولة ذبولها. لذلك فمـن الضرورى أقلمة النباتات المعملية لكى تتحمل الظروف البيئية الجديدة فى الصوبة أو الحقل، وتقوم بالتمثيل الضوئى بكفاءة تحفظ لها حياتها، وتعمل الثغور بكفاءتها لكى تحافظ على المحتوى المائى للنبات وتكوين طبقة شمعية مناسـبة لحماية الخلايا. والشـعيرات الجذرية للنباتـات المعملية عادة ضعيفة ويسـهل جرحها وتقطيعها عند تخليصها من البيئة إذا كانت صلبة تحتوى على آجار. ويجب تخليص الجذور من الآجار لاحتوائه على سـكر يسـاعد على إصابة النباتات بالكائنات الدقيقة. وتحتاج إلى فترة زمنية حتى تعوض ما فقدته من الشعيرات الجذرية. وخلال هذه الفترة قد تتعرض النباتات إلى الذبول والموت. لذلك يفضل تنمية النباتات فى المرحلة الأخيرة من الزراعة الثانوية على بيئة سـائلة تحتوى على ٥٠٪ من مكونات بيئة (MS). ويفضل البعض غمس النباتـات المعملية فى محلول مخفف من الأكسـين لتشـجيع تكويـن ونمو الجذور عليهـا. ثم تنقل إلى تربة أو بيت مـوس ناعم. وقد تعقم التربة بالبخار تحت ضغط أو بأشـعة جاما. ويجب المحافظة على النباتات بعد نقلها إلى التربة وحمايتها من الإصابة بالأمراض والحشرات.

وتتعرض النباتات المعملية إلى فقد قدرتها على المعيشة التكافلية أثناء نموها فى المعمـل. وتحتاج لفترة زمنية عقـب نقلها خارج المعمل حتى تنمو الجذور ويتكون عليها عقد بكتيريـة مثل الرايزوبيوم Rhizobium والميكوريزا Mycorrhiza. وثبت أن إضافة بكتيريا الميكوريزا أثناء فترة التقسـية لنباتات البتولا Birch وLeucaena و*Paxillus involutus* يؤدى إلى تكوين عقد بكتيرية على ٨٠٪ من الجذور وينشـط نمو النباتات المحقونة بمعدل ٧٥٪ بالمقارنة بالنباتات غير المحقونة.

وقد يكون من الضرورى تعريض النباتات لمعاملة باردة (٥°م) لمدة ٤– ٨ أسابيع. وتتم هذه المعاملة فى المعمل أو بعد نقل النباتات مباشـرة إلى البيئة الخارجية لكسر طور السـكون. وكسر طور السـكون له أهميته للأبصال والدرنات والكورمات وبراعم الأشجار والشجيرات لرفع نسبة نجاح نمو النباتات.

وقبل نقل النباتات إلى خارج المعمل تنزع سدادات الأوانى تدريجيا لخفض الرطوبة النسـبية داخلها ورفع حيوية النباتات لمساعدتها على التأقلم مع البيئة الخارجية وتكوين طبقة شمعية فوق طبقة الكيوتيكل. ثم تخفض شدة الإضاءة تدريجيا. وبعد نقل النباتات ترفع الرطوبة النسبية بإحداث شبورة Mist أو ضباب Fog حول النباتات أو زراعتها تحت أغطية من البلاستيك لمدة ١– ٢ أسبوع. وقد تستعمل أحيانا رشاشات مائية مع خفض درجة الحرارة والضوء باستخدام التظليل. وقد تنقل النباتات المعملية إلى صوانٍ كبيرة مقسـمة إلى حجرات مربعة تحتوى على تربة، ثم تغطى بالبلاسـتيك للمحافظة على المسـتوى المرتفع من الرطوبة على أن يتم رفع الأغطية تدريجيا حتى تتـم أقلمة البادرات. وتوجد صوان بلاسـتيك تسـمى Plug plate تحتوى على ٤٠٠ حجرة تملأ ببيئة صناعية مثل البيت موس مضافا إليه مواد منشـطة لتكوين الجذور. والبيت موس قادر على الانتفاخ بعد ترطيبه بالماء ويعمل على تثبيت النباتات. وتوضع هذه الصوانى فى صوبة نصف معقمة وتستخدم فيها رشاشات للمحافظة على الرطوبة النسبية المرتفعة. وبعد اكتمال نمو الجذور تبدأ السوق الحديثة فى النمو، حينئذ تنقل النباتـات إلى الصوبة ويزرع كل نبـات على حده فى التربة. وتنجح هذه الطريقة فى زراعة عقل ساقية متكونة فى المعمل لنباتات Rhododendren Gerbera;

زراعة الأجنة الجنسية

Sexual (Zygotic) embryos

أهمية زراعة الأجنة الجنسية

الأجنــة الجنســية (الزيجوتيــة) ناتجة من اندمــاج محتويات حبــة اللقاح مع محتويات البيضــة. وتفصل الأجنة فى أى مرحلة من مراحل نضج البذرة لزراعتها فى المعمل. ولزراعة الأجنة أهمية فيما يلى:

١- التغلب على حالة عدم إنبات البذور

تســتخدم زراعة الأجنة لبعض الأنواع النباتية التىيســتحيل إنبات بذورها فى الحقل مثل القلقاس *Colocasia esculenta* والموز *Musa balbisiana*

٢- التغلب على ظاهرة السكون فى البذور

قــد يكون صلابة غطاء البذرة ســببا فى منع أو تقليل نفاذ الماء والأكســجين داخــل البذرة. وإنبــات مثل هذه البذور قد يكون بطيئا جــدا وقد يمتنع تماما. وتنبــت هذه البذور بعد إزالة غطائها. وفصل الأجنة غير الناضجة وزراعتها هى وســيلة للتغلب على ظاهرة السكون ومن أمثلة ذلك الورد البلدى والتفاح ونخيل الزيت والأيريس.

٣- التغلب على ظاهرة عدم التوافق

يتــم فصل الأجنة قبل اكتمــال نضجها ثم زراعتها فى المعمــل. ومن أمثلة ذلك الهجــن الناتجة من بعض الأنواع التابعة لجنس الفاصوليا Phaseolus وأنواع الليلى والكتان والقطن والطماطم والأرز والشعير.

٤- إنتاج نباتات متجانسة

بالزراعة المعملية لأجنة أحادية العدد الكروموسومى تنتج نباتات أحادية، وبمضاعفة عدد الكروموسومات بالكولشسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة خصبة.

٥- إكثار الأجنة ثلاثية العدد الكروموسومى

تطبق زراعة الأجنة الجنسية غير الناضجة لإكثار نباتات ثلاثية العدد الكروموسومى، وهى نباتات تعطى بذورا عقيمة غير مكتملة النضج وفيها الإندوسبرم غير مكتمل التكوين، ومن أمثلتها الشعير والشوفان والجويدار. وتنتج النباتات الثلاثية من التهجين بين نباتات ثنائية ونباتات رباعية.

٦- التغلب على ظاهرة الموت المبكر للأجنة

قد يتوقف مبكرا انتقال الماء والعناصر الغذائية للأجنة غير الناضجة ويسبب ذلك موت الأجنة مبكرا. ولوحظت هذه الظاهرة فى هجن بين أنواع ذات النواة الحجرية مثل الخوخ والكريز والمشمش والبرقوق. ولذلك تستخدم الزراعة المعملية الأجنة للتغلب على ظاهرة الفشل المبكر لنمو الجنين فى الحقل.

طرق فصل الأجنة من بعض البذور

تستخدم الأجنة غير الناضجة Immature embryo فى الزراعة المعملية لإكثار النباتات التى تنتج بذورا يموت فيها الجنين مبكرا. لذلك يفضل فى هذه الحالة فصل الأجنة مبكرا من البذور، مع الحرص بعدم إحداث أى ضرر للجنين أثناء فصله، ثم زراعته فى بيئة غذائية مناسبة. وتزرع الأجنة الناضجة Mature embryo للتغلب على ظاهرة السكون. وفصل الأجنة من بذور تامة النضج بسهولة وتزرع فى بيئة غذائية بسيطة مضافا إليها آجار وسكر وعناصر معدنية.

وتعقم الأسطح الخارجية لكل من البذور الناضجة أو غير الناضجة بالطريقة العادية للتعقيم السطحى. بالنسبة للبذور الناضجة تشق القصرة لكى يصبح الجنين ظاهرا ويسهل فصله من الفلقات. أما بالنسبة للأجنة غير الناضجة فيتم فتح غلاف الثمرة بحرص حتى تصبح البويضات المخصبة (أجنة غير ناضجة) وقد تحدد موقعها بدقة ثم تفصل بحرص. و يراعى عدم جرح الأجنة عند فصلها حتى لا تفشل فى نموها أو تكون كالس. ويفضل استخدام ميكروسكوب عند فصل الأجنة إذا كانت صغيرة أو أنسجتها ضعيفة فى وجود مصدر ضوئى بارد (فلوروسنت) مع استخدام شفرة حادة و إبرة حقن. والآتى عرض لفصل بعض الأجنة:

١- **فصل جنين الشعير** Barley embryo، حيث تفصل الحبوب من السنبلة، ثم تعقم وتشطف بماء مقطر، ثم ترص فى أطباق بترى بحيث يكون ظهر الحبة المحتوى على الجنين لأعلى. ثم تزال المنطقة القمية للثمرة ويستبعد غلاف الحبة وغطاء البذرة لكى يصبح الجنين حرا . عندئذ يفصل الجنين بواسطة مشرط ويثبت على بيئة صلبة.

٢- **فصل جنين الكريز** Cherry embryo، حيث تنزع البذور الصلبة من ثمار الكريز وتوضع فى إناء به ماء للكشف عن حيويتها، فالبذور الجيدة تغوص وترسب فى القاع. وتجمع البذور الجيدة ثم تعقم تعقيما سطحيا. وتشق البذرة المعقمة بحيث يصبح الجنين مرئيا. ثم تستخرج الأجنة بحرص باستخدام ملقط مدبب الطرف ثم تنقل مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- **فصل جنين الليلى** Lily embryo، تجمع الثمار بعد ٤٠-٦٠ يوما من الإخصاب وتعقم سطحيا بكحول إيثايل ٩٦٪. ثم تفصل البذور وتوضع فى إناء يحتوى على ماء معقم لمنع جفافها. ويزال غطاء البذرة بكشطه بمشرط حتى يصبح الإندوسبرم مرئيا. ثم يشق غطاء البذرة طوليا فى اتجاهات متعددة. ويفصل الجنين بواسطة دفعه إلى خارج الإندوسبرم ويزرع مباشرة عقب فصله فى بيئة غذائية صلبة.

عوامل إنجاح زراعة الأجنة الجنسية

١- تختلـف قدرة الأجنة على النمو فى المعمل باختلاف الصنف والنمط الوراثى Genotype والعمر الفسـيولوجى، لذلك يجب التعرف إلى خصائص الأجنة ومرحلة النمـو المناسـبة لفصلها. فقد تنجح بعض الأجنة إذا زرعـت فى المعمل بعد اكتمال نضجهـا ولا تنجـح إذا زرعت فى مرحلة مبكرة مـن النضج. ويفضل فصل الجنين ملتصقا به جزء من الإندوسـبرم أو جزء من السـويقة الجنينية Hypocotyl فى حالة صغر عمر الجنين بصورة واضحة.

٢- ينمـو الجنـين جيدا إذا كانت الفلقات أكثر نضجـا وممتلئة بالمواد الغذائية المخزنة. أما بالنسبة للبذور التى تحتوى فلقاتها على مسببات السكون فيجب إزالة الفلقـات قبـل زراعة الأجنة. وأحيانا تعامل نباتـات الزينة المزهرة بالجبرلين قبل فصل الأجنة وهذا يؤدى إلى زيادة حجمها وسهولة فصلها.

٣- يؤدى تحسـين الظـروف البيئية المحيطة بنبـات الأم إلى نمو جيد للأجنة المفصولة منها.

٤- تزرع الأجنة غير الناضجة بعد فصلها مباشـرة على بيئة تحتوى على نسبة مرتفعة من السكر.

٥- يراعـى عدم تلوث الأجنة وعدم الإضرار بها أثناء فصلها من البذور خصوصا إذا كانت بذورا صلبة.

٦- الأجنـة المفصولـة عمـر ٧- ١٤ يوما تنمـى فى ظلام قبل نقلهـا إلى الضوء لتشجيع تكوين الكلوروفيل.

٧- تحتـاج مـزارع الأجنة للأكسـيجين بتركيز أعلـى من تركيزه فـى الهواء الجوى.

٨- درجـة الحرارة المثلى لنمـو الأجنة تختلف باختلاف النوع النباتى. وعادة تحضـن الأجنة بعد زراعتها عند ٢٢- ٢٨°م. بينما يسـتلزم تحضين أجنة بعض الأنـواع النباتيـة مثـل الليلى Lily عنـد (١٧°م)، على أن يبقـى نبات الأم لمدة

٤–٦ أســابيع عند ٥– ٩°م للحصول على نمو جيد للأجنة. وقد يســتلزم تعريض الأجنة لمعاملة باردة (٤°م) لكسر سكونها.

البيئة الغذائية المناسبة لنمو الأجنة

تحتاج الأجنة الناضجة وغير الناضجة إلى بيئة صلبة يتوفر فيها العناصر الكبرى والصغرى والســكر. و تكون حموضتها ٦– ٥ pH. وتســتخدم بيئات عديدة مثل بيئــة Monnier (1976) لزراعة أجنة نبات Capsella bursa-pastoris وأنواع نباتية أخرى، حيث تحتوى على أيونات أمونيا وبوتاســيوم وســكروز. وقد يكون لوجود الجلوكوز والفركتوز فى البيئة أهمية أحيانا. كما أن السكروز له أهمية كمصدر للطاقة ويســاعد على خفــض الضغط الأسموزى للبيئة خصوصا مــع الأجنة غير الناضجة. وتنمو الأجنة الناضجة على بيئة تحتوى على ٢– ٣٪ سكروز، بينما تحتاج الأجنة غير الناضجة إلى بيئة تحتوى على ٨– ١٢٪ ســكروز. ولا تضاف منظمات النمو إلى بيئة الأجنة لاحتواء الأجنة على ما يكفيها منها. وإضافة منظمات النمو للبيئة يؤدى إلى تكويــن كالس. ويفضل إضافة الجبرلين أحيانا لبيئــة الأجنة المفصولة من بذور ســاكنة لدوره الهام فى كسر السكون. وقد يســتلزم إضافة بعض الفيتامينات لمزارع الأجنــة مثل الجلوتامين Glutamine كمصدر هام للنيتروجين وله أهمية خاصة لنمو الأجنة غير الناضجة، كما أن إضافة لبن جوز الهند والكازين Casein hydrolysate ومستخلص المولت لها أهميتها أيضا لنمو الأجنة غير الناضجة.



البـاب الرابع

البيـئة الغـذائيـة Nutritional Medium

صور البيئات الغذائية Forms of media

١- بيئة صلبة Soli medium

هــى بيئة تحتوى على آجــار أو جيلاتين أو Biogels لإكســابها قواما هلاميا. ويفضل اســتخدام آجار نقى مثل Difco- Nobel. ويضاف الآجار بتركيز ٠,٦— ١٪ (وزن/ حجم) أو الجيلاتين بتركيز ١٪ (وزن/ حجم).

٢- بيئة سائلة Liquid medium

هــى بيئة لا تحتوى على آجار ويفضلها كثير مــن الباحثين فى الزراعة المعملية بدلا من البيئة الصلبة.

٣- بيئة ثنائية المظهر Double Phase medium

الاســتعمال المنفرد للبيئة الصلبة أو السائلة فى الزراعة المعملية قد يظهر التزجج Vertification لذلك تســتخدم بيئة مزدوجــة المظهر. وتجهز هذه البيئة بصب بيئة تحتــوى على آجار فى قاع وعاء الزراعة، ثم تــزرع عليها المادة النباتية، ثم يصب فوقها بيئة ســائلة تحتوى علــى نفس مكونات البيئة الصلبــة ولكنها بدون آجار. وبذلك تكون المادة النباتية متواجدة بين بيئة صلبة وبيئة سائلة يحتويان على نفس المكونات الغذائية. وبهذه الطريقة يسهل تغيير الجزء السائل من البيئة كلما تطلب ذلك ببيئة سائلة أخرى مماثلة ولكنها طازجة.

مقارنة بين البيئة الصلبة والسائلة

١- بعض الأنواع النباتية تنمو جيدا فى بيئة سائلة مثل نباتات العائلة Brome-liaceae، بينما ينمو البعض الآخر بصورة جيدة فى بيئة صلبة.

٢- تحتـاج الأجـزاء النباتية المزروعة فى بيئة سـائلة إلى إمداد جيد من الهواء نظرا لانغماسـها فى البيئة. لذلك تثبت الأوعية المزروعة على هزاز كهربائى لرجها بالسرعة المطلوبة حتى لا تصاب الأجزاء النباتية بالضرر.

٣- انخفاض معدل استفادة الجزء النباتى أو الكالس من مكونات البيئة الصلبة، حيث إن سطح الجزء النباتى الملامس للبيئة الصلبة هو المستفيد فقط. بينما تستطيع جميع أسـطح الجزء النباتى المنغمس فى البيئة السـائلة امتصاص العناصر الغذائية ومنظمات النمو لوجود تماس مباشر مع البيئة.

٤- تتركـز الإفـرازات Exudates الخارجة من الأجزاء النباتية فى مكان واحد على البيئة الصلبة مما يؤدى إلى إحداث الضرر أو الإطفار للنموات الجديدة. بينما تنتشر هذه الإفرازات فى البيئة السائلة بالرج، وبذلك يكون لها تأثير أقل ضررا على النموات.

٥- عدم اسـتفادة الجزء النباتى المنغمس تحت سـطح البيئـة الصلبة من تبادل الغازات. بينما الرج المسـتمر للبيئة السـائلة يسـاعد على تبادل الغازات واستفادة الجزء النباتى المنغمس فيها من مكونات البيئة الغذائية.

٦- صعوبة تخليص الجذور من البيئة الصلبة سـالمة بدون أضرار، بينما يسـهل تخليصها من البيئة السائلة.

٧- سهولة تسجيل مقاييس النمو وسرعة التنفس للنموات النامية على بيئة سائلة.

٨- ظاهرة الاسـتقطاب Polarization الناتجة عن تأثير الجاذبية الأرضية تكون واضحـة علـى الكالس المنزرع على بيئـة صلبة، بينما ليس لهـا تأثير واضح على الكالس المنزرع فى بيئة سائلة.

٩- عـدم انتظام انتشـار الضوء بين النباتات النامية علـى بيئة صلبة يؤثر على نموها، بينما يكون انتشار الضوء أفضل فى حالة البيئة السائلة.

١٠- يكون انقسام الخلايا وتكشفها ونموها أسرع على البيئة السائلة.

حركة البيئة السائلة

١- بيئة سائلة ساكنة Stationary liquid medium (Immobile media)

هى طريقة شائعة الاستعمال فى إنتاج المواد الأيضية الثانوية Secondary metabolites وفى زراعة البروتوبلاست. وتكون البيئة السائلة ساكنة لتحسين انقسام ونمو الخلايا ومنع إحداث الضرر بها. وتساعد على انتخاب الطفرات والهجن الناتجة من اندماج البروتوبلاست بسهولة.

٢- بيئة سائلة متحركة Agitated liquid medium

يساعد استمرار حركة البيئة السائلة على وجود تماس مباشر بين سطح الجزء النباتى مع البيئة، وتعظيم استفادته من تجانس انتشار العناصر الغذائية والغازات فى البيئة، واختفاء أعراض نقص العناصر واختناق الجذور، وتساعد حركة البيئة على انتشار الإفرازات السامة فى البيئة وعدم تركيزها فى منطقة الجذور. ويستخدم هزاز كهربائى أو مقلب مغناطيسى لتحريك البيئة السائلة. ويثبت على الهزاز دوارق مخروطية كبيرة، يحتوى كل منها على ٢٠٪ من سعته بيئة سائلة، ويعمل الجهاز بسرعة ٥٠- ١٠٠ دورة/ الدقيقة. بينما يثبت على المقلب المغناطيسى دوارق مخروطية سعة ١٥٠ مللى، يحتوى الواحد منها على ١٥ مللى بيئة سائلة، ويعمل بسرعة ٢٥٠ دورة/ دقيقة. وللحصول على نتائج ممتازة يجب تجديد البيئة كل ١٠ أيام تقريبا.

٣- بيئة سائلة دوارة

تستخدم فى هذه الطريقة عجلة دوارة يثبت عليها دوارق مخروطية محتوية على أجزاء نباتية منزرعة فى بيئة سائلة. وتدور العجلة بسرعة دورة واحدة/ دقيقة مما

يـؤدى إلى انتقال البيئة الغذائية من طرف الـدورق إلى الطرف الآخر تاركة الجزء النباتى منغمسا فى البيئة الغذائية؛ ثم فى تماس معها، ثم معرضا للهواء مما يتيح فرصة لتبادل الغازات. وتستخدم هذه الطريقة فى زراعة الكالس وعديد من الأنواع النباتية.

ماكينات هزازة ودوارة

تستخدم ماكينات هزازة Shakers ودوارة Rotating machines لإسراع نمو الخلايا والأنسـجة النباتية والكورمات الأولية (الكريمات) Protocorms والمرستيمات المزروعة فى بيئة سائلة. ويستمر تشغيل هذه الماكينات لتنشيط تبادل الغازات ما بين الأكسيجين وثانى أكسـيد الكربون وتقليل تأثير الجاذبية الأرضية وتجانس توزيع العناصر الغذائية والهرمونات وانتشار الإفرازات السامة فى البيئة السائلة. ومن هذه الماكينات:

(أ) ماكينات بطيئة الحركة

منهـا ماكينات دوارة بطيئة الحركة مثل عجلة أوركيـد Orchid wheel وماكينة سـتيوارد Steward machine، وتتحرك بسرعة ٢– ٤ دورة/ دقيقة، ومنها ماكينات دوارة أكثر سرعة مثل الجهاز الهزاز الدوار Rotary shakers، ومنها ماكينات تجمع بين النوعين السـابقين. وهذه النوعية من الماكينات تسـمح للأنسـجة المرسـتيمية أو الكورمـات الأوليـة للأوركيد باسـتمرار البقاء فى البيئة السـائلة. وتختلف هذه الماكينـات فى درجة انحدار المنضدة المثبت عليها أوانى الزراعة. فمثلا ميل منضدة عجلة الأوركيد ٤٥° بينما ميل منضدة ماكينة سـتيوارد ١٢– ١٥°. وتسـتخدم مع ماكينات سـتيوارد دوارق زجاجية كبيرة الحجم مسـتديرة القاع ذات زوائد أنبوبية فى المحيط القاعدى لها تسـاعد على تثبيتها. وتستخدم مع عجلة الأوركيد أنابيب اختبار توضع فى سلة أنابيب أو دوارق مخروطية ١٠٠ ملليلتر أو دوارق أصغر منها تثبت بمشدات خاصة Clamps.

(ب) دولاب دوار Rotator wheel

يثبت عليه دوارق مخروطية زجاجية ذات زوائد Nipples أنبوبية فى المحيط القاعدى لها. وتزرع الأجزاء النباتية فى الزوائد الأنبوبية. ويحتوى الدورق الواحد سعة لتر على عشرة زوائد أنبوبية. ويحتوى الدورق ٢٥٠ ملليلتر على ثمانية زوائد أنبوبية. وتساعد حركة دوران الدولاب بمعدل ١- ٢ دورة/ الدقيقة على انتقال البيئة السائلة من جهة إلى أخرى داخل الزوائد الأنبوبية وبذلك يتحسن تبادل الغازات فيها خصوصا إذا كان غطاء الأنبوبة من القطن. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح فى زراعة أنواع نباتية مختلفة.

(جـ) هزاز بسطح مستو Platform shaker

يستخدم هذا الجهاز لتفكيك الأجزاء النباتية إلى خلايا منفردة وتنشيط نموها وتكاثرها. ويستخدم لهذا الجهاز دوارق سعة ١٠٠- ١٠٠٠ مللى تثبت بكلبسات على السطح المستوى للجهاز. وتعتبر الدوارق سعة ١٠٠ مللى المحتوية على ٢٠- ٢٥ مللى بيئة أو الدوارق سعة ٢٥٠ مللى المحتوية على ٧٠ مللى بيئة هى الأمثل لمعظم التجارب، على أن تغلق فوهة الدورق بسدادة قطن أو ورق ألومنيوم. ويعمل الجهاز بسرعة ٣٠- ١٥٠ دورة/ دقيقة.. ويجب أن تكون الحركة تتابعية مدارية منتظمة تقدر من ٢- ٤ سم. ويجب تأمين استمرار عمل الجهاز بدون انقطاع نتيجة إخفاق فى ميكانيكية الجهاز أو قطع التيار الكهربائى. ويجب توفير الظروف المناسبة للنمو مثل الحرارة والعناصر الغذائية وغيرها؛ وتتوفر الآن دوارق تتحمل الحرارة ومزودة بمدخل ومخرج لتسهيل إضافة بيئة طازجة وإخراج البيئة القديمة فى أى وقت أثناء التشغيل. وتوجد أنبوبة لتبادل الغازات يمرر فيها الهواء الداخل للدورق خلال مرشحات تعقيم لمنع التلوث ويساعد على انتشار الخلايا بانتظام فى البيئة الغذائية. كما يوجد مدخل لقياس حموضة البيئة لتجنب التغيرات المحتمل حدوثها أثناء فترة التجربة.

معلق الخلايا Cell suspension

تحضير معلق الخلايا

يحضر معلق الخلايا بزراعة خلية فردية أو مجموعة من الخلايا فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار بهدف تفكيك وإكثار الخلايا. ويمكن المساعدة فى تفكيك الخلايا بالضغط الخفيف على الجزء النباتى الغض أو أجنة أو كالس باستخدام قضيب زجاجى ثم زراعتها فى بيئة سائلة. وتستخدم دوارق مخروطية لها زوائد أنبوبية جانبية تحتوى على بيئة سائلة. وتزرع الخلايا النباتية أو أجزاء من الكالس داخل الزوائد الأنبوبية. وتثبت الدوارق على قرص دوار يتحرك بسرعة دورة واحدة/ الدقيقة. وبذلك تتكاثر الخلايا ويزداد عددها فى البيئة بعد فترة من الحركة المستمرة (Steward and Shantz, 1956). ويستخدم فى ذلك جهاز هزاز ذات مسطح مستو . وتنمو الخلايا وتتكاثر مع استمرار رج البيئة السائلة أثناء فترة الحضانة التىتستغرق ٢١– ٢٨ يوما مع المحافظة على تبادل الغازات وتجانس توزيع الخلايا فى الوسط الغذائى. لذلك فإن دراسة مكونات البيئة السائلة والمحافظة على حموضتها فى اتجاه نقطة التعادل لها أهمية كبيرة فى تسهيل تجزئة وتفكيك خلايا الكالس المتجمعة وتجانس انتشار الخلايا وتماسها المباشر مع البيئة السائلة.

تثبيت الخلايا فى البيئة السائلة

يمكن تنشيط النمو فى بيئة سائلة بدون استخدام أية وسيلة للتثبيت، حيث تغمس الخلايا والأنسجة فى بيئة غذائية مع استمرار الرج بهزاز كهربائى لتوفير التهوية الجيدة. وفى حالة عدم توفير جهاز الرج يمكن استخدام إحدى الطرق الآتية لتثبيت الخلايا :

١- استخدام ورق ترشيح خالٍ من الرماد Ashless filter paper

تعلق كبارٍ من ورق الترشيح فوق سطح بيئة سائلة غير متحركة. ثم تثبت الأجزاء النباتية أو التجمعات الخلوية المتعددة على السطح العلوى لورقة الترشيح. ويساعد ورق الترشيح على إمداد الخلايا أو الجزء النباتى بالبيئة الغذائية ويحافظ على إبقائها فى الهواء فيسهل لها تبادل الغازات.

٢- استخدام قطع اسفنج Viscose sponge تحت ورق ترشيح

تستخدم كبارٍ من ورق الترشيح كحامل للمادة النباتية. و يضاف قطعة اسفنج تحت ورقة الترشيح. وفى هذه الطريقة يمكن إعادة استخدام المواد المستعملة، وإجراء الزراعة الثانوية بعد تغيير البيئة الغذائية وبدون تغيير الإناء المستخدم فى الزراعة. وتسهل هذه الطريقة فحص النموات واستبعاد غير الصالح منها، ويمكن نقل البادرات الناتجة بسهولة إلى التربة كما تتميز بأنها تحتاج إلى كميات أقل من المواد الغذائية.

٣- الغمس Embedding

تغمس الخلايا أو البروتوبلاست فى مركبات مثل جيل بوليمر Polymeric gel أو جيل الجينات الكالسيوم Calcium alginate gel أو Agar أو Agarose. ويعتبر الجينات الكالسيوم من المركبات غير السامة بينما Polyacrylamide غالبا تكون سامة ولا يفضل استخدامها.

٤- الاصطياد الداخلى Entrapment

تستخدم فى هذه الطريقة مناخل أو أغشية ليفية مسامية Hollow– fiber membrane أو فومات مسامية Pre-formed plastic foams أو صوف زجاجى Glass wool أو صوف صخرى Rock wool. كذلك تستخدم ألياف أنبوبية مصنوعة

مــن خلات الســليلوز Cellulose acetate أو ســليكون متعــدد الكربونات Silicone polycarbonate. وترتب هذه الأغشــية على هيئــة حزم متوازية عند طرف الألياف الأنبوبية المحتوية على الخلايا، فيتم اصطياد الخلايا فى المسافات البينية للأغشية الليفية وتمر البيئة الغذائية الســائلة فى فراغات الألياف. وتستخدم شبكة من مادة Polyurethane foam لاصطيــاد الخلايــا حيث تنمو فى صورة تجمعات خلوية مع الاحتفاظ بحيويتها كاملة.

٥- التثبيت على كرات زجاجية

تعلق الخلايا على كرات زجاجية داخلها فجوة هوائية تساعدها على الطفو فوق البيئة السائلة.

الزراعة الثانوية لمعلق الخلايا

عندما يصل أحد العناصر المكونة للبيئة الغذائية إلى مرحلة الاستنزاف يصبح هو المتســبب فى انخفاض سرعة نمو وانقســام الخلايا، وتكون هذه الفترة هى المناسبة للبدء فى الزراعة الثانوية المتكررة للخلايا. وتتم الزراعة الثانوية باســتخدام ماصات أو حقن لنقل أحجام محددة من معلق الخلايا إلى بيئة ســائلة طازجة تحتوى على نفس المكونات للبيئة الســابقة. ويفضل أخذ الكميات المطلوب زراعتها من الســطح العلوى لمعلق الخلايا.

مراحل انقسام الخلايا المعلقة

١- مرحلة تلكؤ الانقسام The lage phase

يحدث عقب الزراعة فى بيئة ســائلة دخول الخلايا فى مرحلة سكون حركى مع زيادة نشــاط فســيولوجى. وتبدأ هذه المرحلة بسلســلة مــن عمليات التمثيل الغذائــى تتهيأ بعدها الخلايا للانقســام الميتوزى. ويحــدث أثناء مرحلة التمثيل

الغذائـــى زيادة القـــدرة الاختزالية وإنتاج مركبـــات ATP والكربوهيدرات كمصدر للطاقة. لذلك يعتبر إضافة الســكروز للبيئة هامــا جدا كمصدر للطاقة. حيث يتم أكسدة السكروز بواسطة دورة تحلل الجلوكوز Glycolysis ودورة البنتوز Pentose Phosphate pathway ودورة حمض تراى كربوكسيليك Tricarboxylic acid وتزداد ســرعة تمثيل البروتينات والأحماض النووية. كما تتأثر بشدة حالة ثبات مستوى إنزيم mRNAs بما تحتويه البيئة الغذائية من الأكســين ونشاط إنزيم -Phenylala nine ammonia lyase.

٢- مرحلة انقسام الخلايا Cell division phase

فى هذه المرحلة تبدأ الخلايا فى الانقسام وتستمر فى الانقسام حتى يصبح واحدا أو أكثر من عناصر البيئة هو السبب فى بطء أو توقف الانقسام. وفى تجربة زرعت خلايـــا القمة النامية لنبات الخرشـــوف Jerusalem artichoke وحضنت عند ٢٥°م. وبعـــد ســـبعة أيام زاد عدد الخلايا بمقدار ١٠ أضعاف العـــدد الذى بدأ به. وخلال هذه الفترة زادت كمية الأكسجين المستهلك فى التنفس، وزاد ثبات الحمض النووى RNA خلال ثلاثة الأيام الأولى من الزراعة المعملية، وزادت ســـرعة تمثيل البروتين نســـبيا وانخفاض المواد الثانوية الممثلة مع تغير بســـيط فـــى حجم الخلايا وتميزت باحتوائها على فجوات صغيرة ولم يحدث لها تكشف.

٣- مرحلة الثبات العددى Stationary-phase

تنخفض بوضوح ســرعة انقســـام الخلايا عندما يصـــل كثافتها مرحلة الثبات العددى فى البيئة الســـائلة، وينخفض تنفســـها وتمثيـــل الحمض النووى RNA وتمثيـــل البروتين مع زيادة عدد الخلايا المحتوية على فجوات عصارية. ويرتبط توقف الخلايا عن الانقســـام بزيادة تجمـــع بعض المركبات الأيضية الثانوية مثل بعض القلويدات والأنثوســـيانينات والفينـــولات والأنثراكوينون. وثبت أن ظهور

المركبات الأيضية الثانوية يكون مصحوبا بتكشــف محدود لخلايا نباتات العائلة الباذنجانيــة Solanaceae خصوصا إذا لم تســتبدل البيئة الغذائية ببيئة حديثة التجهيــز. فمثلا إذا لم تجدد زراعة الكالس الخاص لنباتى *Atropa belladonna* و*Hyoscyamus niger* بعــد نهاية أربعة الأســابيع الأولى مــن الزراعة قد يكون ذلك ســببا فى تنشــيط نمو الجذور والســوق وتكوين نموات تشبه الأجنة خلال الأســابيع الأربعة التالية. وفى المرحلة الأخيرة من طور الثبات العددى للخلايا Late stationary-phase قــد تتكون الأجنة وتتكون مركبات Tropane alkaloids مثل Atropine وكثير من مركبات Hyoscyamine وScopolamine. وتتجمع هذه المركبات فى التكوينات الخلوية المتكشــفة وقد تتجمــع فى التجمعات الخلوية البســيطة. وقد تظهر بعض التكشــفات الخلوية وبعض الأعضاء النباتية بعد أن تصبــح العناصر الغذائية وقد قاربت على النفاذ من البيئة الغذائية. ويتأثر ظهور هذه التكشــفات بتمثيل مواد ثانوية مشــابهة لما تنتجــه النباتات الكاملة. وتعد هذه ظاهرة طبيعية تبين أن ســلامة تكوين المواد الأيضية الثانوية مرتبط بســلامة التركيب البنائى للخلايا.

الكثافة الحرجة للخلايا المعلقة

تعــرف الكثافة الحرجة للخلايا بأنها أقــل كثافة من الخلايا يجب حقنها فى البيئة الســائلة لكى تبدأ فى النمو والانقســام بصورة جيدة. فقد يؤدى زراعة عدد قليل من خلايا الكالس فى بيئة سائلة إلى فشلها فى استعادة قدرتها على الانقسام، وقد تنمو هذه الخلايا وتنقسم بسرعة إذا زرعت بكثافة أكبر فى بيئة غذائية مماثلة. لذلــك فــإن تقدير الكثافة الحرجة للخلايا فى البيئة الســائلة عند بدء التجربة له أهمية. وتتهيأ الخلايا ســريعا للانقســام عقب زراعتها فى البيئة السائلة، ويزداد عددهــا بتعدد انقســامها حتى ترتفع كثافة الخلايا فى المعلق. عندئذ تبدأ ســرعة انقســام الخلايا فــى الانخفاض تدريجيا نتيجة تزاحمهــا. ويمكن أن يكون واحد

أو أكثـر مـن عناصر البيئة الغذائية هو المحدد لهذا الانقسـام والوصول إلى مرحلة الثبات العددى للخلايا Stationary phase. وعند هذه المرحلة يستلزم إجراء الزراعة الثانوية Sub-culturing بهدف زيادة عدد الخلايا بما يكفى واحتياج العمل. ويمكن رسم خط بيانى يوضح العلاقة بين معدل نمو الخلايا أثناء فترة التحضين ابتداء من فترة ما بعد الزراعة مباشـرة حتى الوصـول إلى مرحلة ثبات عدد الخلايا. ويفضل إجـراء الزراعـة الثانوية بأخذ عينـات من معلق الخلايا قبـل وصولها إلى مرحلة الثبات أو عقب وصولها إلى هذه المرحلة مباشرة بدون تأخير للمحافظة على حيوية الخلايا وقدرتها على النمو والتكاثر. وتحديد مرحلة الثبات العددى للخلايا يكون وفقا للعدد الأولى للخلايا عند بدء الزراعة وسـرعة نموها. ويفضل أن يكون التركيز الأولى للخلايا ما بين ٠,٥ – ٢,٥ x ١٠^{٥} خلية/ سم^{٣}. ويزداد هذا التركيز أثناء فترة الحضانة فيصبح ١ – ٤ x ١٠^{٦} خلية/ سم^{٣}. و يعنى ذلك أن جميع الخلايا انقسمت بمعدل ٤ – ٦ مرات فى فترة ١٨ – ٢٥ يوما. وإذا تم سحب عينة من الخلايا لإعادة زراعتها فإن الفترة اللازمة لبلوغها التركيز المذكور تصل إلى ٦ – ٩ أيام فقط.

تقدير عدد الخلايا المعلقة

لقياس عدد الخلايا فى السـنتيمتر المكعب يسـتلزم إضافة حجم واحد من معلق الخلايا إلى حجمين من محلول ٨٪ ثالث أكسيد الكروميك Chromium trioxide. ثم ترفع درجة حرارة المحلول إلى ٧٠°م لمدة ٢ – ١٥ دقيقة. وتحدد هذه الفترة الزمنية تبعـا لمرحلة نمو الخلايا فى البيئة الغذائية. بعدها يترك الخليط ليبرد ثم يهز بقوة لمـدة ١٠ دقائق فى جهاز هزاز. ويفضل إضافـة البكتين إلى معلق الخلايا للحصول على نتائج أفضل. ويخفف محلول الخلايا بمعدل مناسب لكى تصبح الخلايا سهلة العد والفحص تحت المجهر. ويتطلب الفحص المجهرى استخدام شرائح زجاجية تحتوى على ثلاث قنوات يصل عمقها إلى ١٢٠٠ ميكروميتر حيث يكون هذا العمق مناسـبا لمعظم خلايـا الأنواع النباتيـة المختلفة. وتنقل عينة مـن معلق الخلايا إلى

الشريحة وتترك فترة لكى تهدأ الخلايا وتثبت. ويمكن تحديد عددها تحت المجهر بقوة تكبير ١٠٠ مرة. ثم يتم حساب عدد الخلايا فى قناة واحدة تختار عشوائيا من القنوات الثلاث بالشريحة. ويكرر ذلك لخمس شرائح تحتوى على عينات من نفس معلق الخلايا تحت الاختبار. ويجب أن تحتوى القناة الواحدة على ٥– ١٠ خلايا، فإذا كان حجم القناة الواحدة يساوى ٠,٩٩ ميكرولتر (μL) فإنه يمكن حساب عدد الخلايا على أساس واحد سنتيمتر مكعب.

توجيه الخلايا المعلقة نحو النمو والتطور

تنشط سلسلة من العمليات الحيوية والفسيولوجية أثناء نمو الخلايا. فتمتص الخلايا حاجتها من البيئة الغذائية وتقوم أيضا بإفراز مواد أيضية. وتتأثر البيئة بكل من ظاهرتى الامتصاص والإفراز. ويتأثر بالتالى سرعة انقسام الخلايا واتجاه نموها. ويمكن توجيه الخلايا إلى النمو والتطور بتغيير المحتوى الغذائى للبيئة. والعلاقة المتوازنة للأكسين والسيتوكاينين فى البيئة لها تأثير على تكشف الكالس. فزيادة تركيز السيتوكاينين (KIN) بالنسبة للأكسين (IAA) فى البيئة الغذائية يؤدى إلى تكشف ونمو الأفرع من الكالس. وزيادة تركيز الأكسين بالنسبة للسيتوكاينين يشجع تكوين الجذور. والتركيزات غير المتوازنة من السيتوكاينين والأكسين يؤدى إلى اضطراب النمو أى لا يتكشف منه نموات خضرية ولا جذور. وهذه هى القاعدة العامة لعدد كبير من الأنواع النباتية لتوجيه النمو نحو تكوين نموات خضرية أو جذرية، وتختلف الأنواع النباتية فى احتياجاتها المثلى للأكسينات والسيتوكاينينات، كذلك المكونات الأخرى للبيئة الغذائية لها أهمية فى تحديد مسار النمو. وفى الواقع أن ميكانيكية تأثير منظمات النمو لم تتضح بعد. ويعتمد نشاط الخلايا الناتج عن تواجد منظمات النمو والمكونات الأخرى بالبيئة الغذائية على العمر الفسيولوجى للخلايا المزروعة وأصل النسيج المأخوذ منه الجزء النباتى وطول مدة بقاء الخلايا فى المعمل (Skoog and Miller, 1957).

المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحديد المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحتوى البيئة الغذائية على حوالى ٢٠ مركبا. وتتكون أساسا من ماء وسكر وعناصر معدنية ومنظمات نمو (جدول ١). ويفضل الرجوع إلى الدراسات السابقة لتحديد البيئة المناسبة للنبات تحت الدراسة بدلا من إجراء سلسلة اختبارات لتحديد البيئة وتركيز كل مكون فيها، وقد يستغرق ذلك فترة زمنية طويلة. لذلك يجب أن تبدأ التجارب الأولية بثلاثة تركيزات (منخفض، متوسط، مرتفع) على عناصر البيئة للنبات تحت الاختبار كالآتى:

- السكروز: يحضر عادة بتركيزات ١٪ و٢٪ و٤٪.
- العناصر المعدنية: تستخدم بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962 كأساس تحضر منها تركيزات ٢٥٪ و٥٠٪ و١٠٠٪ من قوة العناصر المعدنية المذكورة بها.
- الأكسينات مثل: Indole- 3- Butyric Acid (IBA) ويحضر بتركيزات ٠,٠١ و٠,٥ و٥ ملليجرام/ لتر.
- سيتوكاينينات مثل: 6-Benzyl Adenine (BA) وتحضر بتركيزات ٠,٠١ و٠,٥ و٥ ملليجرام/ لتر.

فإذا كان المطلوب إجراء تجارب أولية على ٤ عوامل هى: السكروز والعناصر المعدنية و(IBA) و(BA). ويحضر من كل مركب فى ثلاثة تركيزات. فيكون عدد التراكيب المطلوب تحضيرها هى $٣^{٤}$ = ٨١ تركيبة. لذلك تجرى تجارب زراعة الأنسجة على ٨١ تركيبة غذائية. واختيار أفضلها من حيث تأثيرها على سرعة النمو وجودته. وبهذا يتم الوصول إلى الهدف فى أقصر فترة ممكنة. وقد يستلزم إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد التركيز الأمثل من الأكسين أو السيتوكاينين. فإذا ثبت من التجربة الأولى أن أفضل تركيز مثلا هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر. فيفضل إجراء سلسلة اختبارات أخرى تحتوى على تركيزات أقل وأعلى من ٠,٥ مثل ٠,١، ٠,٣، ٠,٥، ٠,٨، ١ ملليجرام/ لتر. وقد يستلزم إجراء سلسلة اختبارات أخرى إذا تغير نوع المحصول.

جدول (١) المكونات الرئيسية للبيئات الغذائية المستخدمة فى الزراعة العملية

الماء					
عناصر معدنية				مواد عضوية	
كبرى		صغرى			
نيتروجين	N	حديد	Fe	سكريات	
فوسفور	P	زنك	Zn	أحماض أمينية	
بوتاسيوم	K	منجنيز	Mn	فيتامينات	
كالسيوم	Ca	نحاس	Cu	منظمات نمو:	
ماغنسيوم	Mg	بورون	B	١- أكسينات	Auxins
كبريت	S	كوبالت	Co	٢- سيتوكاينين	Cytokinis
		نيكل	Ni	٣- جبرلين	Gibberellins
		ألومنيوم	Al	٤- حمض أبسيسيك	Abscisic acid
		موليبدنم	Mo	٥- إيثلين	Ethylene
معقدات طبيعية:				مستخلصات نباتية:	
- مستخلص خميرة		رقم الحموضة	PH	كازين	Casin hydrolysate
- لبن جوز الهند				بيبتون	Pepton
				تريبتون	Trypton

أهمية مكونات البيئة الغذائية

١ - الماء Water

الماء من أهم المركبات فى البيئة الغذائية لأنه الوسط الذى تذوب فيه جميع المكونات، ويستلزم استخدامه فى صورة مقطرة ومعقمة بدرجة عالية. ويفضل استخدام

جهاز من الزجاج البيركس Pyrex لتقطير الماء مرتين. خصوصا لمزارع البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب تنظيف جهاز التقطير من الداخل بصورة منتظمة للتخلص من الرواسب والشوائب العالقة بالجهاز والمحافظة على جودة الماء المقطر. ويلحق بجهاز التقطير جهاز مزيل للأيونات De- ionizer. ويفضل البعض استخدام أغشية أسموزية لترشيح وتنقية الماء المقطر بهدف مزيد من النقاوة والتعقيم. ويخزن الماء المقطر فى أوانٍ من البوليثين Polythene، حيث يمكن أن تنطلق من جدر الأوانى الزجاجية إلى الماء المقطر آثار من الرصاص والصوديوم والزنك التى يحتويها الزجاج كشوائب. وإذا كان لابد من استخدام الزجاج لتخزين الماء فيجب أن يكون من النوع البيركس.

٢ – السكر Sugar

السكروز من المركبات الهامة جدا الذى يتم تمثيله طبيعيا فى النبات. ولابد من تواجده فى البيئة الغذائية لأهميته كمصدر للطاقة فى تكوين النموات الجديدة. وترجع أهميته إلى عدم كفاءة النباتات المعملية فى بناء السكريات نتيجة ضعف الكلوروفيل وضعف الإضاءة. أو إطالة فترة الظلام التى تتعرض لها النباتات المعملية أحيانا مما يساعد على توقف البناء الضوئى تماما. كما أن تركيز ثانى أكسيد الكربون الناتج عن تنفس النباتات المعملية يكون محدودا وغير كاف لعملية التمثيل الضوئى (George, 1993; Pierik, 1997;). ومن الناحية العملية يصعب إمداد البيئة بغاز ثانى أكسيد الكربون، وزيادة تركيزه داخل الأوانى المزروعة يؤدى إلى تسمم النباتات. ويضاف السكروز للبيئة بنسبة ١– ٥٪. وقد يستخدم الجلوكوز والفركتوز والمالتوز والجالاكتوز والسكريات الكحولية مثل الجلسرول والسوربيتول. ويعتمد تركيز السكروز المضاف للبيئة على نوع وعمر النبات النامى. فالأجنة الصغيرة جدا تحتاج إلى نسبة عالية من السكروز. وزيادة تركيز السكروز فى البيئة عن التركيز الأمثل يؤدى إلى تدهور النموات نتيجة تثبيط عملية التمثيل الكربونى وتثبيط تكوين الكلوروفيل والسكروز المتوفر فى السوبر ماركت مناسب لارتفاع نقاوته إذ يحتوى على ٩٩,٩٤٪ سكروز

و ٠,٠٢٪ مـــاء و ٠,٠٤٪ ســكريات أخرى مثل الفركتوز والجلوكــوز. وتعقيم البيئة بالأوتوكلاف قد يحدث تغييرات للسكريات. كما أن زيادة رقم حموضة البيئة عامل هام فى إحداث هذه التغيرات. وتساعد زراعة أجزاء جذرية فى البيئة على إحداث تغيير فى الســكروز نتيجة نشــاط إنزيم الإنفرتيز Invertase المفرز من خلايا الجذر. واختلفت آراء الباحثين حول تأثير تعقيم الســكر بالأوتوكلاف. ويســتخدم السكروز فى زراعة البروتوبلاســت للمحافظة على الضغط الأسمــوزى للبيئة الغذائية وحماية البروتوبلاســت من الانفجار. ويضاف السوربيتول Sorbitol أو السكروز بتركيز ٠,٢٣ مولــر للمحافظة على البروتوبلاســت فى البيئة الغذائية. ويعتبر الســوربيتول أفضل مصــدر للكربوهيدرات فى البيئات الخاصة بزراعة أنســجة نباتــات العائلة الوردية Rosaceae. ويســتخدم السكروز بدلا من السوربيتول مع بعض الأنواع التابعة للعائلة الوردية. ومن ناحية أخرى تنمو أنسجة بعض النباتات مثل الخوخ صنف Reliance فى وجود السوربيتول بصورة أفضل بالمقارنة بالسكروز.

٣ - الأملاح المعدنية Mineral salts

تشمل الأملاح المعدنية على العناصر الضرورية الكبرى وهى النيتروجين والفوسفور والبوتاســيوم والكالســيوم والماغنســيوم والكبريت، ونقصها يســبب موت النبات. والعناصــر الضرورية الصغرى وهــى الحديد والمنجنيز والنحــاس والزنك والبورون والموليبدنم والكلور والكوبالت. ويؤثر نقصها على انتظام سير العمليات الحيوية فى النبات، ولا تكون سببا مباشرا فى موت النبات.

وتعتبر بيئة Murashige and Skoog (MS) (1962) من أكثر البيئات استعمالا فى الزراعة المعملية. وتستجيب لها معظم النباتات بسهولة. وقد تكون بيئة (MS) غير مناسبة لنمو بعض النباتات ذات الحساسية الشديدة للتركيزات المرتفعة من العناصر مثل نباتات *Rhododendron; Gerbera; Kalmia* وبعض النباتات الخشــبية؛ لذلك قد تســتخدم تركيزات مخففة من بيئة (MS) أو تستخدم بيئة أخرى منخفضة فى العناصــر المعدنية مثل بيئة (Lloyd and Mc Cown, 1980; Woody Plant Media

(WPM) Grattapaglia and Machado, 1998). ويفضل تحضير الأملاح باستخدام تركيز الأيونات بالمليمولر. وتتعدد البيئات وتختلف فى محتواها من العناصر بما يتناسب مع اختلاف حساسية النباتات تحت التجربة. وتعتبر بيئة (MS) غنية فى الأملاح، بينما بيئة Knop's فقيرة فيها. ويحتاج النبات ٢- ٢٦ ملليمول/ لتر بوتاسيوم، و١- ٥ ملليمول/ لتر من كل من الفوسفات ($H_2PO_4^-$) والكالسيوم (Ca^{++}) والماغنسيوم (Mg^{++}) والكبريتات (SuO_4^-). ويعتبر الحديد من العناصر الهامة فى البيئة لتأثيره المباشر على نمو وتكشف الأجزاء النباتية المزروعة. ويجب تواجد الحديد والعناصر المعدنية الأخرى فى صورة قابلة للامتصاص. مع العلم بأن أملاح الحديد فى صورة سترات Citrate وطرطرات Tartrate صعبة الذوبان فى الماء وترسب بعد تحضيرها فى البيئة الغذائية. بينما تميزت بيئة (MS) بوجود الحديد فى صورة مركب Fe-EDTA؛ وهو من المركبات المخلبية المفضلة بالمقارنة بأملاح الحديد الأخرى لأهميته فى تنشيط تكوين الأجنة والنموات، ويؤخذ عليه عدم الثبات فى البيئة بعد تعقيمها بالأوتوكلاف؛ حيث يتحد مع مركبات أخرى ويرسب بعد عدة أيام. لذلك يفضل عليه مركب FeNa- EDTA لاحتوائه على الحديد والصوديوم.

ويضاف النيتروجين إلى معظم البيئات فى صورة أمونيا (NH_4^+) أو نترات (NO_3). فإذا كانت كمية النيتروجين المطلوب إضافتها للبيئة ١٢- ٦٠ ملليمولر فيجب أن يكون تركيز الأمونيا ما بين ٦- ٤٠ ملليمولر. وتمتص معظم النباتات النترات بصورة أفضل من الأمونيا، بينما تمتص بعض النباتات الأمونيا بصورة أفضل من النترات. وامتصاص النبات لأيونات الأمونيا يؤدى إلى انخفاض رقم حموضة البيئة وإسالة الآجار ويؤدى بالتالى إلى امتصاص النيتروجين فى صورة نيتريت (NO_2) Nitrite. وفى أنواع نباتية عديدة وجد أن للنيتروجين المختزل تأثيره واضحا على نمو الأجزاء النباتية فى المعمل. وأن أيون الأمونيا (NH_4) فى صورة كلوريد أمونيا NH_4Cl أو نترات أمونيا NH_4NO_3 يحقق نموا جيدا لكالس نباتى الكمثرى والتفاح. وإضافة

الأحماض الأمينية وخاصة الأســبرجين Asparagine أو الجلوتامين Glutamine إلى البيئة فى وجود الأمونيا لم يُعْطِ أية زيادة ملحوظة فى النمو .(Nitsch, et al., 1970) ويدخل النيتروجين فى تركيب الأحماض الأمينية والبروتين والكلوروفيل والأحماض النووية (RNA ; DNA). ويدخل النيتروجين فى تركيب الإنزيمات التى تعتبر عاملا حيويا هاما تزيد من ســرعة التفاعلات الحيوية بالخلية النباتية، ويدخل فى كثير من الهرمونات النباتية مثل الأكسينات التى تحتوى على حلقة الإندول مثل (IAA) والســيتوكاينينات مثل الكاينتين (KIN) والبنزايل أدينين (BA). ويســاعد الأكسين على نمو النباتات وتكوين الجذور وكسر السكون وينشط السيتوكاينين تكوين الأفرع والتكاثر وزيادة عدد النباتات.

ويدخل الفوســفور فى تكويــن الفوســفوليبيدات والأحماض النوويــة ومركبات جلوكوز-١-فوسفات وأدينوزين ثلاثى الفوسفات (ATP) وأدينوزين ثنائى الفوسفات (ADP) وأدينوزيــن أحــادى (AMP) وجميعها مركبات تمــد الخلية بالطاقة. بينما يدخل الماغنســيوم فــى تركيب الكلوروفيــل ويعمل على زيادة اللــون الأخضر فى النبات. وغيابه يؤدى إلى اصفرار النباتات ولا تســتكمل دورة حياتها. ويؤدى نقص الكالســيوم فــى النبات إلى عدم تكويــن الصفيحة الوســطى Middle lamella أثناء انقســام الخلية واصفرار النبات وإصابة القمة النامية بالقرح Necrosis وظهور ظاهرة التزجــج Vertification فى النباتات المعملية. ولا يســتطيع النبات اســتكمال دورة حياته فى غياب عنصر الكالســيوم. والبوتاســيوم من العناصر الضرورية للنبات لأنه يســاعد على امتصاص الماء وانتقال السكريات. ولم يعرف حتى الآن المركبات التى يدخل البوتاسيوم فى تركيبها. ويؤدى غياب البوتاسيوم كلية إلى فقد النبات قدرته على تكملة دورة حياته. والكبريت من العناصر الضرورية ويدخل فى تركيب بعض الأحماض الأمينية مثل السيســتين والسيســتائين والميثيونين وجلوتاثيون. ويساعد الكبريت على إتمام تفاعلات الأكســدة والاختزال ولا يســتطيع النبات تكملة دورة حياته فى حالة غيابه كليا.

٤ - الآجــار Agar

يستخلص الآجار من حشائش البحر Seaweeds فى صورة حبيبات Pellets. ثم ينظف وينقى للتخلص من المواد الســامة. ويوضح جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشــوائب العضوية وغير العضوية. ويســتخدم الآجار كمادة غروية فى معظم البيئات الغذائية. والآجار من مشــتقات السكريات المتعددة Polysacchrides ذات الــوزن الجزيئــى الكبير. ولــه القدرة على ربط جزيئات المــاء فيحول البيئة السائلة إلى غروية. ويخفض ظاهرة التزجج نتيجة انخفاض نسبة الرطوبة المتصة. ويضاف آجار Difco Bacto Agar إلى البيئة الغذائية بتركيز ٠,٦ ٠,٨٪. وللآجار القــدرة على الارتباط بجزيئات الماء وادمصاص المركبات الكيميائية بالبيئة. وزيادة تركيــز الآجار إلى ١٪ فى البيئة يؤدى إلى تصلب البيئة جدا ويصعب ثبات الجزء النباتى عليها نتيجة انخفاض الماء الميسر بالبيئة الغذائية مما يؤخر تكوين الجذور وانخفــاض التلامس بين المــادة النباتية والبيئة الغذائية ممــا يؤدى إلى انخفاض قدرتها على امتصاص الماء والعناصر الغذائية. وإذا استخدم الآجار بتركيز أقل من ٠,٤٪ تصبح البيئة غير متماسكة Sloppy خصوصا إذا كان رقم الحموضة منخفضا أيضا. بينما إذا اســتخدم التركيز ٠,٦٪ وظلت البيئة غير متماســكة لذلك يجب الرجــوع إلى تصحيــح حموضة البيئة، لأن رقم الحموضــة إذا كان أقل من ٤,٥– ٤,٨ يؤدى إلى عدم تماســك البيئة. ومضمون ذلك أن نمو المادة النباتية يتأثر بنوع الآجار وتركيزه، لذلك يفضل اســتخدام آجار نقــى وعالى الجودة. ويوضح جدول (٣) محتــوى أجار Difco من العناصر. وبالرغم من وجود أنواع أخرى معروفة من الآجار مثل Flow agar; Gibco phytagar إلا إنه يفضل زراعة البروتوبلاســت أو الخلايــا الفردية فى آجــار نقية جدا مثل الأجاروس Agarose. ويمكن اســتبدال الآجار بمركبات أخرى مثل:

– البوليمرات الصناعية Synthetic polymers مثل البيوجيل Biogel P٢٠٠. وهو عبارة عن حبيبات بولى أكريليميد Polyacrylamide pellets.

– الجينات الصوديوم Sodium alginate ويســتخدم فى زراعة البروتوبلاست .
ومواد من الســليولوز المتبلــور Cellulose crystallite aggregate (CCA) ولها أهمية خاصة فى تكوين جذور القنبيط.

– معقد الجيل رايت Gelrite وهى مادة غروية عالية النقاوة، تتكون من سكريات عديدة مثل الجلوكورونيك Glucuronic والجلوكوز والرامـنوز Ramnose وأرثو أسيتيل ميوتيــز O-Acetyl moieties. ومعقد Gelrite قادر على تكوين جيل لامع فى وجود ملــح المائدة. وتعتمد قــوة هذا الجيل على نوع الملح المضــاف. فالكاتيونات الثنائية مثل الماغنســيوم (0.1% سلفات ماغنسيوم MgSO4 .7H2O) والكالسيوم تعطى جيلا أقوى من الجيل المضاف إليه أيونات أحادية التكافؤ مثل الصوديوم أو البوتاســيوم. ويحتاج Gelrite إلى حرارة وتوفير كاتيونات ليكون القوام غرويا. ويوصى باستخدام ٠,٢٪ جيل رايت. ويؤخذ عليه أنه يحتوى على آثار من مركبات فينولية قد تسبب سمية للنموات الناتجة فى المعمل.

– مادة نشــوية تســتخلص من نبــات *Nephrolepis exaltata* تســتخدم بتركيز ١٢جرام/ لتر بيئة، وتذوب فى الماء بدون استخدام حرارة.

جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشوائب العضوية وغير العضوية

الآجــار المكونات	Bacto agar%	Noble agar%	Purified agar%
Ash	4.5	2.16	1.75
Calcium	0.13	0.23	0.27
Barium	0.01	0.01	0.01
Silica	0.19	0.26	0.09
Chloride	0.43	0.18	0.13
Sulphate	2.54	1.90	1.32
Nitrogen	0.17	0.10	0.14

جدول (٣) محتوى Difco Bacto Agar من العناصر

العناصر	التركيب (جزء في المليون)
Cadmium	0.5 - 0.0
Chromium	0.1 - 0.0
Manganese	0.5 - 0.1
Zinc	10.0 - 0.0
Copper	1.5 -0.5
Iron	5.0 - 1.5
Lead	0.5 - 0.0
Magnesium	430.0 - 210.0

٥ - معقدات طبيعية Natural complex

هــي معقدات طبيعية مثل عصائر الطماطم والبرتقال والعنب والأناناس وماء جوز الهند والموز المهروس ومستخلص الخميرة ومستخلص المولت. وتحتوى هذه المعقدات ومستخلصاتها على تركيزات عالية من السكروز وعناصر غذائية ومركبات هامة أخرى يستلزم دراستها لمعرفة مكوناتها وعلاقتها بتنشيط النمو. فقد وجد أن زراعة أنسجة مفصولة من نباتات الموالح على بيئة مضافا إليها ١٠٪ عصير برتقال قد نمت بكفاءة تعادل ستة أضعاف مثيلتها التى لا تحتوى على عصير برتقال، وتعادل مثيلتها التى تحتوى على ١٠٪ ســكروز (Einset, 1978). كذلك ثبت أن ماء جوز الهند يحتوى علــى مركبات عديدة مثل Myoinositol الــذى يدخل فى تركيب البيئات الغذائية كمنشــط للنمو، ويدخل أيضا فى بناء الفوســفوليبيدات والمواد البكتينية فى الجهاز الخلــوى وفى بناء الغشــاء البلازمى. ويضــاف Myoinositol إلى بيئة أنواع نباتية

عديد مثل البلارجونيوم Pelargonium hortorum بتركيز ٥٠– ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ويعتبر هاما جدا لنمو كالس نبات Faxonus pennsylvanica وتكشف كالس نبات Hawoethia. ويساعد ماء جوز الهند على نمو وتكشف الأنسجة النباتية المزروعة فى المعمل لأنواع نباتية عديد مثل أجنة نبات الداتورا ونخاع نبات التبغ ومرستيم القمة النامية لنبات Pharbitic nil. ويحتوى ماء جوز الهند على مركبات عديدة لها أهميتها فى انقسام الخلايا مثل Diphenylurea والسيتوكاينين الطبيعى Zeatin ومركب مشابه للكينيتين (KIN) وهو أحد مركبات السيتوكاينينات. كما يحتوى على العديد من الأحماض الأمينية الحرة مثل فينيل ألآنين Phenyl alanine الذى له دور فعال فى انقسام خلايا نبات فول الصويا. ويضاف ماء جوز الهند للبيئة الغذائية بمعدل ٥٠– ١٥٠ ملليلتر/ لتر (٣– ١٥٪) . وتعتمد الكمية المضافة من ماء جوز الهند على عمر الثمرة حيث يتغير تركيبه بتقدم عمر الثمرة. وإضافة ماء جوز الهند مع الأكسينات للبيئة الغذائية يؤدى إلى انقسام سريع للخلايا. كذلك ثبت أن ماء ثمار جوز الهند الناضجة يحتوى على سيتوكاينين يسمى 9-β-D-Ribofuranosylzeatin ولذلك يستخدم السيتوكاينين فى حالة عدم توفر ماء جوز الهند. كما يحتوى على نيتروجين مختزل له تأثير منشط قوى لنمو الأنسجة النباتية المختلفة. ويستخلص ماء جوز الهند بثقب الثمار بواسطة مثقاب كهربائى. ويجمع الماء من كل ثمرة على حدة فى كأس مستقل. ويختبر السائل للتأكد من صلاحيته. ثم يجمع الماء من الثمار السليمة ويرشح خلال شاشة جبن. ويعقم الراشح بالأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ١٢١°م ثم يترك ليبرد طول الليل. ثم يرشح فى صباح اليوم التالى، ويحفظ فى وعاء بلاستيك ذات غطاء قلاووظ عند ٢٠°م.

٦- معقدات طبيعية أخرى

تستخدم بعض المعقدات الطبيعية الأخرى كمصادر للنيتروجين حيث تحتوى على أحماض أمينية وفيتامينات مثل كازين Casein–hydrolysate ويضاف بتركيز ٠,١– ١ جرام/ لتر. والبيتون Peptone ويضاف بتركيز ٠,٢٥– ٣ جرام/ لتر. والتربتون Tryp-

tone ويضاف بتركيز ٠,٢٥ – ٢ جرام/ لتر. ومستخلص المولت Malt extract ويضاف بتركيز ٠,٥ – ١ جرام/ لتر. ومستخلص الخميرة Ycast extract، ويضاف بتركيز ٠,٢٥ – ٢ جرام/ لتر. وتستخدم الخميرة لاحتوائها على نسبة مرتفعة من فيتامين B .

٧ - معقدات متنوعة Miscellaneous compounds

(أ) أمينات متعددة Polyamincs

تستخدم هذه المركبات لتشجيع خلايا الكالس على تكوين الأجنة. ومن هذه المركبات Putrescine; Spermidine; Spermine. ولوحظ زيادة مركبات Spermidinc; Putrescine طبيعيا فى أجنة نبات الجزر ونبات *Mcdicago sativa* أثناء نموها، وإضافة مثبط البولى أمينات Polyamines inhibitor يتوقف تكوين الأجنة، وبإضافة أى مركب من الأمينات المتعددة تستأنف الأجنة نشاطها. ويتواجد مركب Putres- cine متزامنا مع بدء تكوين أجنة الجزر. وتساعد الأمينات المتعددة أيضا فى تكوين الجذور العرضية. ومضمون ذلك أن الأمينات المتعددة والإنزيمات المرتبطة بنشاطها لها أهمية فى انضباط النمو وتطوره، ولها أهمية كبيرة أيضا فى حفظ الأنسجة والأصول الوراثية النادرة لفترات طويلة للاستفادة بها مستقبلا. ويبدو أن مركب Pu- trescine مشتق من الحمض الأمينى L-Arginine. وأن الأمينات المتعددة لها القدرة على منع تحويل الميثيونين Methionine إلى إيثلين Ethylene. والتوازن الداخلى بين الإيثلين والأرجينين والأمينات المتعددة له دور هام فى انضباط تكوين الأجنة الجسمية (Rugini and Wang, 1986).

(ب) مركب فينايل يوريا ومشتقاته Phenylurea and its derivatives (DPU)

يعتبر مركب (DPU) مثبطا لإنزيم المؤكسد للسيتوكاينينات Cytokinin oxidase، لذلك يعمل (DPU) على زيادة نشاط السيتوكاينينات (Horgan, 1986). ويعتبر إنزيمى

Thidiazol ureas (Thidiazuron); Pyridyl ureas ومشتقاتهما من أكثر المركبات نشاطا وفاعلية، ويعادل نشاطهما ١٠ آلاف مرة قدر نشاط (DPU)؛ كما أنهما أكثر نشاطا من الزايتين Zeatin (سـيتوكاينين طبيعي). وينشط انزيم Thidiazuron نمو الأفرع لنباتات أشجار خشبية عديدة ، ويؤدى تركيز ٠,٠٥– ٠,١ ميكرومولر من انزيم Thidiazuron إلى زيـادة ملحوظة فـى عدد أفرع نبـات *Celtis occidcntalis* أكثـر بالمقارنة بتركيز ٤– ١٠ ميكرومولر من مركب (Meyer and (BA) Kemsh, 1986). لذلك يجب أن تنال هذه المركبات اهتمام الباحثين.

(جـ) الأدنـين Adenine

يضاف الأدنين فى صورة سلفات أدنـين Adenine sulphate لسهولة ذوبانه فى المـاء. ويضـاف بمعدل ٢– ١٢٠ ملليجرام/ لتر للبيئة سـابقة التجهيز الموجودة فى الأسـواق (Nitsch, et al., 1967; Skoog and Tsui,1948). ويشـجع الأدنين تكوين الأفرع على أجزاء نباتية متعددة.

٨ - الأكسينات والسيتوكاينينات

تعـرف الهرمونات Hormons بأنها مركبات عضوية يتـم تمثيلها فى النباتات الراقية بصورة طبيعية. وهى مركبات يظهر أثرها المنشـط والمنظم فى النبات عندما يكـون تركيزهـا منخفضا. وفى الأسـواق الآن توجد منظمات نمـو صناعية مماثلة للمركبات الطبيعية فى تأثيرها الفسـيولوجى (Picrik, 1997). ويطلق على المركبات الطبيعية والصناعية اسـم منظمات نمـو Growth regulators لأهميتها الكبيرة فى تنظيم نمو النبات وتطوره وتوزيع المركبات الممثلة فى النبات وانقسام الخلايا وزيادة عددها وحجمها. وللأكسـينات Auxin والسيتوكاينـينات Cytokinin أهمية كبيرة فى الزراعة المعملية. ومن المستحيل نجاح زراعة الأنسجة فى المعمل بدون منظمات نمو سواء كانت موجودة طبيعيا فى النسيج أم مضافة للبيئة الغذائية. والاتزان بين منظمـات النمو المضافـة للبيئة ومنظمات النمو الموجـودة طبيعيا فى الجزء النباتى

لــه أهمية كبيرة فى تنظيم النمو وتكوين الشــكل الخارجــى للنموات. وعلى ذلك فالأجزاء النباتية التى تحتوى طبيعيا على قدر كاف من الأكسين أو السيتوكاينــين لا تحتــاج إلى إضافة مثــل هذه المركبات إلى البيئة. والأنســجة الحديثة Juvenile لهــا القدرة على الانقســام وإنتاج نموات جديدة بدون إضافــة منظمات نمو للبيئة لاحتوائها طبيعيا على منظمات نمو. بينما تحتاج الأنسجة البالغة Adult إلى إضافة منظمات نمو للبيئة لتنشــيط خلاياها على الانقســام. وطبقا لاحتياج النبات تقسم البيئات إلى بيئة يضاف إليها أكســينات فقط وبيئة يضاف إليها ســيتوكاينينات فقط وبيئة يضاف إليها (اكســينات + ســيتوكاينينات) وبيئة لا تحتاج إلى إضافة منظمات نمو. ويعتبر Skoog and Miller, (1957) أول من أوضح العلاقة بين تركيز الأوكســينات والســيتوكايننات وأهمية التوازن بينهما فى البيئة الغذائية وأثر ذلك على طبيعة نمو وتكشف الأنسجة المزروعة. وتختلف النسبة بينهما باختلاف النوع النباتى. ويتم التعرف إلى النســبة المثلى من خلال البحث والتجربة. وتحتاج كثير من الأنســجة النباتية بشكل رئيسى إلى السيتوكاينينات فى حين لا يعتمد البعض الآخر على وجودها. وقد تبين أن احتياج الأنسجة النباتية إلى السيتوكاينينات هى صفة وراثية. ويعتبر المعدل الطبيعى فى جميع البيئات الأساســية لمزارع الأنســجة بالنســبة هــو ٠,٥ ملليجرام/ لتر ســيتوكاينين + ٥ ملليجرام/ لــتر IAA فإذا زاد تركيز الأكسين IAA يتكشف الكالس إلى جذور، وإذا انخفض تركيز الأكسين وزاد الســيتوكاينين يتكشــف الكالس إلى أفرع وأوراق جديدة ونبيتات جديدة ذات سوق وأوراق وجذور.

وعند تحضير البيئة تذاب الأكسينات IAA; IBA; NAA فى الماء، وتكون أسهل فــى الإذابة إذا كانت فى صورة ملح بوتاســيوم. ويمكن إذابتهــا أيضا فى صورتها الحامضية فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم. ويمكن إذابة الســيتوكاينينات أيضا فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم، بينمــا يذاب الجبرلين فى الماء. وتخزن محاليــل IAA والكينيتين فى الظلام لأنها غــير ثابتة فى الضــوء، بينما BA; 2,4–D ; NAA; IBA تكون أكثر ثباتا فى وجود

الضوء. ويفقد مركب IAA نشــاطه فى محلوله المائى تدريجيا بإطالة فترة التخزين، كما يفقد نشاطه أيضا بواسطة إنزيمات البيروكسيديز Peroxidase والإندول أسيتيك أسيد أوكسيديز IAA-Oxidase.

٨-١- الأكسينات Auxins

تضاف الأكســينات غالبا للبيئة لتنشــيط نمو الكالس وتكوين الجذور العرضية. وتــؤدى التركيــزات المنخفضة من الأكســينات إلى تكوين الجــذور العرضية، بينما التركيــزات المرتفعة منها تمنع تكوين الجذور وتؤدى إلى تكوين الكالس. وتثبط نمو الســوق العرضية والإبطية لعدم قدرتها على كســر الســيادة القمية، كما أنها تثبط تكوين الأجنة فى معلق الخلايا. وتعمل الأكسينات على استطالة الخلايا وانتفاخها وانقســامها وانتظــام التكوين الظاهــرى للنموات خصوصا إذا كانــت فى اتزان مع السيتوكاينين (Pierik, 1997). وتتأثر الأكسينات كثيرا برقم الحموضة وكمية العناصر بالبيئة الغذائية. وتشمل الأكسينات العديد من المركبات أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA); 3-Indole Butaric Acid (IBA);
2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T); Naphthalene AceticAcid (NAA);
2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D); 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA);
4-Amino- 3,5,6- Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ويعتبر (IAA) من الأكسينات الضعيفة ويتكون طبيعيا فى النبات ويخلق صناعيا. ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠,٠١– ١٠ ملليجرام/ لتر. وتعتبر الأكســينات الصناعية مثل (2,4-D ; NAA ; IBA) من الأكسينات القوية وتضاف للبيئة بتركيز ٠,٠٠١– ١٠ ملليجرام/ لتر. (Torres, et al., 2001) ويرشــح مركب (IAA) قبل إضافته للبيئة الغذائية باســتخدام مرشــحات بكتيرية لأن تعقيمه بالأوتوكلاف يؤدى إلى تكسيره وتقليل فاعليته. ويحفظ فى زجاجات بنية لأنه يفســد بالضوء. كذلك تحفظ البيئة المحتويــة على (IAA) فى ظلام تام حتى لا تفســد فاعليتــه. وتعمل الإضاءة على

تكســير هذا الأكسين فى البيئة الغذائية بعد ١٤ ســاعة من التحضين. كذلك يتأثر (IAA) بالحموضة والأملاح. ويلاحظ أن هذا الأكسين لا يذوب فى الماء ويجب إذابته أولا فى كحول إيثانول أو هيدروكســيد البوتاســيوم. ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام (IAA) فى هيدروكســيد بوتاســيوم تركيز واحد عيارى ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب بالماء المقطر.

ويســتخدم (2,4- D) بتركيز عالٍ كمبيد حشــائش وبتركيزات منخفضة فى مزارع الأنسجة للمساعدة على تكوين الكالس بالاتزان مع السيتوكينـين. ويستخدم (2,4- D) فى مزارع الأنسجة فى نطاق محدود لأنه يساعد على إحداث الطفرات ويثبط أحيانا عملية التمثيل الضوئى، ولتجنب ذلك يوصى باستخدام مركب TCP بدلا من 2,4- D. بينما لا تسبب (IAA, NAA) هذه الآثار. وتختلف نباتات الفلقة الواحدة عن نباتات الفلقـتين فى استجابتها لتأثير (2,4- D). ويرجع ذلك إلى قدرة نباتات الفلقة الواحدة على امتصاص (2,4- D) وقدرة هذه المادة على تغيير السلوك الفسيولوجى حيث تمنع تكوين الصفيحة الوســطى Middle lamella وتتلفها أثناء انقســام الخلايا. وثبت أن الأكسين (CPA) هو الأقل تأثيرا بالمقارنة بالأكسينات (2,4- D; 2, 4, 5- T). وبمقارنة بالأكســين (IAA) وجد أن (2,4-D) يحفز النمو بمقدار ٨– ١٢ مرة، وأن (2, 4, 5-T) يحفـز النمو بمقـدار ٤ مرات، بينما (CPA) يحفز النمو بمقدار مرتين فقط.

ويستخدم الأكســين (NAA) بكثرة فى مزارع الأنســجة النباتية لتكوين الكالس أو تكويــن المجموع الجذرى فى المرحلة النهائيــة، ويعتبر أقل تأثيرا من IAA من حيث القدرة على إيقاف أو منع تكشــف الأجزاء النباتية. والتركيزات المخففة من NAA تؤدى إلى تنشيط تكوين الجذور لبادرات العائلة *Brme-liaceae* (Pierik, et al., 1984). ويلاحظ أن الاتزان الداخلى للأكســينات والسيتوكينينات هو المحدد فى جميع حالات نمو النبات.

ويــذوب NAA فى الإيثانول وهيدروكســيد البوتاســيوم، ويحضــر بإذابة ١٠٠ ملليجرام من الهرمون فى هيدروكســيد البوتاســيوم تركيز واحد عيارى، ثم يكمل إلى ١٠٠ ســنتيمتر مكعــب (فى هذه الحالة يكون ســنتيمتر واحــد مكعب يعادل

واحد ملليجرام). بينما يذاب 2,4- D فى كميات قليلة من هيدروكسـيد البوتاسيوم (KOH). ويخفف المحلول بعد ذلك بإضافة الماء المقطر للوصول إلى الحجم المطلوب. وقد يسـتخدم مركـب Dimethyl sulfoxide لإذابة الهرمونات فيه. وإندول حمض البيوتريك (IBA) من الأوكسـينات الهامة المسـتخدمة على نطاق واسع فى مزارع الأنسـجة النباتيـة بهدف تكوين المجمـوع الجذرى. وهذا الهرمون ثابت نسـبيا بالمقارنـة بمركـب (IAA)، حيث إنه يتحمل التعقيم ولا يتأثر بالحرارة أو الضوء، ويـذوب أيضا فى كحول الإيثانول وهيدروكسـيد البوتاسـيوم. ويتم تحضيره مثل تحضير مركب IAA.

٨- ٢- السيتوكينينات Cytokinins

السـيتوكاينينات مركبات عضوية مشـتقة من الأدنـين Adenine (أمينوبيورين Aminopurine). ولها دور هام فى انقسـام الخلايا ونمو أنسـجة النبات وتؤثر على العديد مـن العمليات الفسـيولوجية مثل تأخير الشـيخوخة Senescence للخلايا وتنشـيط حركة العناصر المعدنية ونضج الكلوروبلاسـت وضبط التكوين المورفولوجى للنبـات (Torres, et al., 2001). كما أن للسـيتوكاينين القدرة على تثبيط السـيادة القمية وتنشيط نمو الأفرع الجانبية وكسر طور السكون، وتثبط نمو الجذور (George, 1993). ومـن أكثـر السـيتوكاينينات اسـتخداما 2iP , BA , KIN (Pierik, 1997). ويـذاب الكاينـيتـين (KIN) فى الماء، ثم يعقم فى أوتـوكلاف تحت ضغط بخارى واحد كيلوجرام/ سـم٢ لمدة عشـرة دقائق. ويذوب الكاينـيتين و(BA) فى قليل من حمض الهيدروكلوريك ١,٠ عيارى. وتشمل السيتوكاينينات:

6-Benzyl Amino Purine (BAP); 6- Benzyl Adenine (BA); Isopentenyl adenine (IPA); 6- y- y- Dimethyl ally Amino Purine (2 ip); 6- Furfuryl- Amino Purine (Kinetin).;

5- (4- Hydroxy- 3- Methyl- trans- 2- Butenylamino) Purine (Zeatin).

أهمية التوازن بين الأكسينات والسيتوكينينات

الاتزان بين الأكسين والسيتوكاينين مطلوب غالبا لانتظام تكوين السوق والجذور العرضية. ففى مرحلة الزراعة الثانوية يجب أن يكون مستوى السيتوكاينين أعلى من الأكسين، بينما ينشط تكوين الجذور إذا كان الأكسين فى مستوى أعلى من السيتوكاينين، وقد يكون وجود السيتوكينين فى البيئة غير ضرورى أحيانا (Torres, et al., 2001) (شكل ١).

تركيز السيتوكاينين		تركيز الأكسين
منخفض +	تكوين الجذور على العقل	+++++++++++ مرتفع
+	تكوين الكالس فى نباتات أحادية الفلقات	++++++++++
++	أول مرحلة فى تكوين الأجنة	+++++++++
++++	تكوين الجذور العرضية من الكالس	+++++++
++++++	تكوين الكالس فى نباتات ثنائية الفلقات	+++++
++++++++	تكوين أفرع عرضية	+++
مرتفع +++++++++++	نمو أفرع إبطية من ساق نبتة مزروعة	+ منخفض

شكل (١) تأثير توازن الأكسين: السيتوكاينين على النمو والتكشف

٨-٣- الجبرلين Gibberellins

يؤدى إضافة (الجبرلين + الأكسين) إلى استطالة الخلايا والسلاميات ونمو المرستيمات. ويضاف الجبرلين للبيئة لكسر سكون الأجنة والبراعم والبذور والدرنات وغيرها. ويثبط الجبرلـين تكوين ونمو الجـذور. وتضاف الجبريلينـات (GA7 + GA3) لبعض مزارع الأنسجة، و(GA3) هو من أكثر المركبات استعمالا، والجبريلينات حساسة جدا للحرارة حيث يؤدى تعقيمها بالأوتوكلاف إلى تحطيم ٩٠٪ من نشاطها البيولوجى.

٩- منظمات نمو أخرى

٩-١- أوليجوسكارين Oligosaccharins

تدخل الأوليجـوسـكاريـن فى تركيب جدر الخلايا وتنظم سـرعة النمو وتكشف الجـذور والأزهار ونمو البراعم الخضرية، ولهـا أهمية فى حماية النبات ضد بعض الأمراض وتغييرات الظروف البيئية.

٩-٢- حمض الأبسيسيك Abscisic acid (ABA)

ثبت أن حمض الأبسيسيك له تأثير سلبى على مزارع الأنسجة وعلى نمو الكالس وتكوين الجنين.

٩-٣- الإيثلين Ethylene

الأجـزاء النباتية هـى المصدر الرئيسـى للإيثلين المتجمع فى أوانـى الزراعة، والأوعيـة البلاسـتيكية مصدر آخر للإيثلين. ويزداد تجمعه خلال الأيام الخمسـة الأولى من الزراعة ثم ينخفض بعد ذلك. ويؤدى زيادة تجمعه إلى تثبيط نمو وتكوين الأعضـاء النباتية. ووضع أنبوبـة تحتوى على برمنجانات بوتاسـيوم داخل وعاء الزراعة يؤدى إلى التخلص من حوالى٧٠٪ من الإيثلين. وللإيثلين دور هام فى تكوين الأبصال (Van Aartrijk, et al. 1986).

٩- ٤- فلوروجلوسينول Phloroglucinol

هـو مركـب فينولى لـه تأثير مثبـط لإنزيـم IAA-Oxidase المسـئول عن تحلل الأوكسين IAA. لذلك فإن له القدرة على تنشيط النمو وتكوين السوق. ويؤدى إضافة فلوروجلوسينول مع IAA إلى البيئة إلى تنشيط نمو الجذور.

٩- ٥- مركبات فينايل يوريا Diphenyl urea compounds

تسـتخدم هـذه المركبـات بدلا مـن السـيتوكاينـينات بهدف تنشـيط النموات الجانبية. حيث تقوم هذه المركبات بوقف نشـاط إنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينيـن. وبالتالى تحتفظ الخلايا بمستواها الداخلى من السيتوكاينـين التى لها أهمية فى عمليات التضاعف الكروموسومى.

١٠- فيتامينات Vitamins

معظـم النباتات قادرة علـى تمثيل الفيتامينات إلا إنه لم يدرس الاحتياج الفعلى للأجـزاء النباتية مـن الفيتامينات. ويضاف واحد أو أكثر مـن الفيتامينات لتحفيز النمـو. حيث ثبت أن حامض الفوليك وحمض (PABA) يحفزان النمو ولكنهما غير أساسيين فى البيئة. وأن الثيامين Thiamine- HCl أساسى لنمو كالس نبات التبغ. وحمض الأسـكوربيك لايحتاجه النبات ولكنه يشـجع علـى النمو فقط فى غياب أو انخفاض تركيز الثيامـين. ويضاف حمض الأسـكوربيك كمركب مضاد للأكسـدة وحماية الأجزاء النباتية من الاسوداد (جدول ٤).

جدول (٤) التركيز المناسب من الفيتامينات

التركيز/ لتر	الفيتامين
5 - 0.1	Thiamin (Vitamin B1)
10 - 0.1	Riboflavin (Vitamin B2)

تابع جدول (٤)

الفيتامين	التركيز/ لتر
Pyridoxin (Vitamin B6)	1 - 0.1
Panthothenic acid	2.5 - 0.5
Folic acid	0.5 - 0.1
Nicotinic acid	5 - 0.1
Para-Aminobenzoic acid (PABA)	1 - 0.5
Myo-inositol	200 - 100
Ascorbic acid (Vitamin C)	100 - 1
Biotin (Vitamin H)	1 - 0.1
Tocopherol (Vitamin E)	50 - 1

١١ - أحماض أمينية Amino acids

الأحماض الأمينية لها أهميتها إذا كان النبات غير قادر على بناء البروتين بالقدر الكافي لاحتياجه. ويضاف الكازين Casein hydrolysis للبيئة كمصدر للأحماض الأمينية بنسبة ٠,٠٥ -٠,١٪. ويضاف غالبا Tyrosine; Glycine; L-Asparagine; L-Glutamine كمصادر إضافية للأمونيا بمعدل ١٠٠ ملليجرام/ لتر. وقد يضاف سلفات الأدنين Adenine sulfate إلى البيئة لتحسين النمو وتكوين الأفرع. ويضاف Biotin; Glycine كمصادر للنيتروجين العضوى.

١٢- الفحم النباتى النشط Activated charcoal

ينتج الفحم النباتى بتفحيم الخشب عند حرارة مرتفعة فى وجود بخار الماء.

ويحتوى الفحم على فراغات بينية دقيقة جدا تجعل مساحة المسطح الفعال به كبيرة وقادرة على ادمصاص جميع المواد السامة والغازات. ويحتوى الفحم النباتى على ٩٥–٩٩٪ فحم نشــط، لذلك يفضل الفحم النباتى عن الفحم الحيوانى. ويفضل اســتخدام الفحم نباتى النوع Merck No. 2186، ويضاف للبيئة بتركيز ٠,٢–٣٪ (وزن/ حجم) ومن أهم مميزاته: إكساب البيئة لونا غامقا فتصبح مناسبة لنمو الجذور وامتصاص:

– الصبغات السامة الملونة الناتجة من المركبات الفينولية مثل الميلانين وغير الملونة الأخرى.

– المواد السامة التىتفرزها الأجزاء النباتية المفصولة من الموز والأشجار الخشبية.

– المركبــات العضوية مثل منظمات النمو والإيثلين والفيتامينات والحديد والزنك وغيرها.

– مركــب Hydroxy methyl furfural (HMF) الناتج من انحلال الســكروز أثناء التعقيم.

– مركب فينيل حمض الخليك Phenyl acetic acid وحمض البنزويك Benzoic acid التى تنتجها النباتات النامية فى المعمل.

– يساعد على انتظام وثبات رقم حموضة البيئة الغذائية.

ويضــاف الفحــم النباتى للبيئة كحافــز لنمو وتكوين الأعضــاء Organogenesis والأجنــة Embryogenesis لأنــواع عديدة مثــل تكوين الأجنة مــن متوك الأنيمون Anemone والتبــغ Nicotiana والفيوناريــا Funaria والأوركيــدات Orchids وأجنة نخيــل البلح والقمم النامية لنبــات الزنجبيل Ginger والبصل والجزر البرى، بينما يعتبر مثبطا لنمو فول الصويا وكالس نبات التبغ (Ammirato, 1983).

البيئات الغذائية شائعة الاستعمال

تتكــون البيئات أساســا من أمــلاح العناصر الأساســية الكــبرى والصغرى مضافا إليها ســكروز كمصدر كربونى ومواد أخرى مثــل الفيتامينات والأحماض الأمينية

والأوكسـينات والسـيتوكاينينات والجبرلـين والمركـب المخلبـى EDTA وبعض المسـتخلصات الطبيعيـة مثل ماء جـوز الهند وخلاصة الخمـيرة وعصير الطماطم وغيرها. وقد تكون مكونات البيئة المناسـبة لتحفيز جزء نباتى معين ليكون كالس ليسـت من الضرورة أن تكون مناسبة لتكشف النموات الخضرية والجذرية من هذا الكالس. كما أن مكونات البيئة السـائلة المناسبة لنمو جزء نباتى معين لا يعنى أن تكون مناسبة لإحداث نفس الأثر إذا كانت بيئة صلبة. وتستخدم عديد من البيئات فى معامل زراعة الأنسـجة والخلايـا النباتية. وتختلف هذه البيئات فى مكوناتها ومن أشهر هذه البيئات:

١- بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962

وهى من أشـهر البيئات الغذائية، وتسـتخدم بكثرة فى معامل زراعة الأنسـجة والخلايا النباتية. وتسـتخدم لتحفيـز الأجزاء النباتية على النمـو وتكوين نباتات كاملة لاحتوائها على نسب عالية من النيتروجين والبوتاسيوم. كذلك تستخدم بيئة (MS) لإجـراء التجـارب عليها عندما يكون الاحتياج الفعلـى للنبات غير معروف وأن النبات غير حسـاس للتركيزات المرتفعة من العناصر. فإذا كان النبات حساسـا للأملاح فيسـتخدم خليط العناصر الغذائية الكـبرى والصغرى لبيئة Heller, 1953، وإذا كان النبات حساسا جدا للأملاح فتستخدم بيئة Knop, 1884.

٢- بيئة White (WH), 1963

وتتميز باحتوائها على تركيزات منخفضة جدا من النيتروجين والبوتاسيوم بحيث لا يتناسب مع إحداث نمو جيد للكالس والخلايا النباتية. وعلى الباحث أن يدخل بعض التغييرات المناسـبة على تركيز هذين العنصرين بما يناسب نوع النبات تحت التجربة (جدول ٥).

٢ – بيئة Gamborg, et al. (B5), 1976

استخدمت لأول مرة فى زراعة خلايا نبات فول الصويا، وتتميز بارتفاع نسبة النيتروجين والبوتاسيوم. وتستخدم بعد إضافة (2, 4- D) للبيئة بهدف تحفيز الخلايا على الانقسام والتكاثر السريع.

جدول (٥) مكونات بيئة White (WH) من العناصر الصغرى والكبرى

Conc. mg/ l	Micro-elements	Macro-elements	Conc. mg/ l
$FeSO_4.7H_2O$	-	KNO_3	80
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	288
$MnSO_4.4H_2O$	4.55	NH_4NO_3	-
$MnSO_4.H_2O$	-	$(NH_4)_2SO4$	-
$ZnSO_4.7H_2O$	2.67	$NaH_2PO_4.H2O$	19
H_3BO_3	1.5	KH_2PO_4	-
KI	0.75	KCl	70
$CuSO_4.5H_2O$	0.001	$CaCl_2.2H_2O$	-
Na_2EDTA	-	$MgSO_4.7H_2O$	737
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	Na_2SO_4	200
MoO_3	0.0001		
$CoSO_4.6H_2O$	-		

ارشادات عامة عند تحضير البيئة

١– تحضــر محاليل مركــزة من جميع الأملاح المعدنيــة والفيتامينات ومنظمات النمو والهرمونات التى تدخل فى تركيب البيئة الغذائية (جداول ٦– ١٠). ويفضل ترشيح هذه المحاليل باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) قبل حفظها.

وتحضــر العناصر الكــبرى والصغرى كل علــى حدة بكميات تكفى مســتقبلا لعدة تحضــيرات من البيئة. وتخزن هذه المحاليل فى ظلام فى غرفة عادية. ويوجد فى الأســواق مخلوط من العناصر الكبرى والصغرى سابقة التجهيز وتسمى تجاريا MS-salts، على أن تتبع الإرشــادات المســجلة على العبوة لتجنب بعض المشــاكل مثل سرعة الترسيب.

٢– تحفــظ المحاليل المركزة بعيدا عن الأتربة ومصادر التلوث عند ٢– ٤°م، مع مرعاة عدم تكوين رواســـب أو تغيير لونها. ويجب استخدام هذه المحاليل فى فترة لا تزيد عن ٣٠ يوما.

٣– تجزأ محاليل الفيتامينات ومنظمات النمو المركزة فى أنابيب اختبار، تحتوى كل أنبوبة على القدر المطلوب إضافته للبيئة عند تحضيرها ثم تخــزن الأنابيب عــند (–٢٠°م) لحــين وقت استعمالها لضمان سلامة محتوى الأنابيب من التلوث. وتحفظ المحاليل المركزة لإندول حمض الخليك (IAA) فى مكان مظلم عند ٢– ٤°م.

٤– تضاف خلاصة الخميرة والسكر والإنزيمات إلى البيئة عند تحضيرها. ويضاف ٠,٦– ١٪ آجــار عند تحضــير البيئة الصلبة، ويفضل أن يكــون الآجار على هيئة مسحوق.

٥– يرشح لبن جوز الهند عقب استخراجه من الثمار ثم يعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند (–٢٠°م) لسرعة فساده

٦– قبل تعقيم المركبات سريعة التلف بالأوتوكلاف يفضل ترشيحها أولا باستخدام ورق ترشــيح رقم (٣) ثم تعقم باســتخدام مرشــحات التعقيم Millipore MF filters

مسامية (0.22 µm). وعند ترشيح المحاليل المخففة جدا من منظمات النمو خلال مرشحات التعقيم يفضل التخلص من الكمية الأولى من الراشح لاحتمال إدمصاص جزء من الهرمون على سطح المرشحات مما يسبب انخفاض تركيزه.

٧- تكتب جميع البيانات على الأوانى المحتوية على المحاليل مثل اسم المادة وتركيزها وتاريخ التحضير وأى بيانات تضمن سلامة المحاليل واستخدامها قبل فسادها وفقد جودتها.

٨- إذا كان المطلوب استخدام بيئات صلبة أو سائلة مثل البيئات المستخدمة فى زراعة الأجنة فتوضع أنابيب الاختبار على مسطح مائل عقب تعقيمها واستخراجها من الأوتوكلاف عند ٤٥- ٥٠°م .

٩- يستخدم ماء خالٍ من الأيونات De-ionized water بدلا من استخدام مياه الصنبور لارتفاع محتواه من أيونات الكالسيوم الذى يترسب فى قاع الأوتوكلاف.

١٠- يجب تحديد زمن التعقيم ودرجة الحرارة اللازمة للتعقيم. وقد تستخدم بكتيريا *Bacillus stearothermo- phillis* كدليل بيولوجى للتعرف على سلامة التعقيم حيث تموت بعد ١٢- ١٥ دقيقة من التعقيم عند ١٢١°م.

خطوات تحضير البيئة الغذائية

١- تحضر العناصر الكبرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 1).

٢- تحضر العناصر الصغرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock .solution 2).

٣- يحضر محلول يحتوى على حديد مخلبى Fe-Chelate بمفرده فى لتر واحد.

٤- يوضع دورق زجاجى يحتوى على ٥٠٠ ملليلتر ماء مقطر على مسطح ساخن لتسخين الماء، ثم تضاف إليه الكمية المطلوبة من السكر، ويرفع المحلول مباشرة عن السخان بمجرد وضع السكر.

٥- يضـاف إلى محلول السـكر الكميات المطلوبة من العناصـر الكبرى والعناصر الصغـرى والحديـد المخلبى مـع التقليب الجيد، ثم يوضع بعد ذلك على المسـطح الساخن حتى الغليان.

٦- تضـاف الأحمـاض الأمينية المطلوبة بالتركيز المحـدد لها. وتختلف نوعها وكميتها باختلاف نوع النبات.

٧- تضـاف الفيتامينـات للبيئة خصوصـا فيتامين (B_1) لأهميتـه حيث لا يتم تخليقه فى النبات، وذلك بالتركيز المحدد للنبات تحت التجربة. وقد لا يسـتلزم إضافـة فيتامينـات إذا كانت أجزاء ورقية أو خلايا أو كلوروبلاسـت لأنها تحتوى على فيتامينات مخلقة ذاتيا.

٨- يضـاف أحيانا بعض المعقدات الطبيعية مثل لبن جوز الهند وعصير الطماطم وعصير البرتقال ومستخلص الخميرة ومستخلص النشا والكازين لقدرتها العالية على تنشيط النمو.

٩- تضـاف منظمات النمو (الأكسـينات والسـيتوكاينينـات) عـادة بتركيزات منخفضة جدا مع مراعاة الاتزان بينهما ونسـبة الإضافة حسب الهدف من الزراعة. وقد يضاف الجبرلين لبعض البيئات إذا كان له أهمية.

١٠- تضبط حموضة البيئة عند ٥.٧ - ٥,٨ باستخدام جهاز pH- meter ويستخدم فى ذلك محاليل مخففة من هيدروكسـيد صوديـوم وحامض هيدروكلوريك. ثم يضاف الآجار عند تحضير البيئة الصلبة فقط. ويخلط الآجار مع ماء بارد مع التقليب الجيد ثم يضاف إلى البيئة. ويجب عدم إضافة الآجار أثناء غليان الماء حتى لا يحدث طبخ زائد له ويسبب تأثيرات ضارة. ويفضل إضافة الآجار باستخدام قمع مع الحرص بعدم تكوين تكتلات فى المحلول أو حدوث فوران أو رغاوى. ثم يستكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر.

١١- توزع البيئة المحضرة على أوانى الزراعة (أنابيب، دوارق مخروطية، برطمانات). ويراعى انتظام توزيع البيئة الغذائية ومنع التصاقها بالجدار الداخلى أو الخارجى.

□□□

جدول (٦) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من الأيونات

Medium Component	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM
N-Total	10.942	16.036	7.058	27.385	76.756	27.336	60.017
NH_4^+	-	7.567	-	8.994	2.028	2.608	20.612
NO_3^-	10.942	8.469	7.058	18.391	24.728	24.728	39.405
$H_2PO_4^-$	1.837	1.837	0.906	0.500	1.087	2.608	1.249
K^+	4.310	1.837	10.060	9.897	25.815	24.728	20.042
Ca^{2+}	4.234	4.234	0.510	1.496	1.163	1.360	2.993
Mg^{2+}	1.014	1.014	1.014	0.751	1.014	1.623	1.501
SO_4^{2-}	1.014	4.789	1.014	0.751	2.028	1.623	1.501
Na^+	-	-	7.964	-	-	-	-
Cl^-	-	-	11.080	2.991	2.325	2.721	5.986

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Helder, 1953. 4. Nitsch, 1972.
5. Gamborg, et al , B5, 1976. 6. Schenk & Hildebrandt, SH, 1972.
7. Murashige & Skoog , MS, (1962)

جدول (٧) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الكبرى

(ملليجرام/لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
KNO3	250	-	-	950	2500	2500	1900
NaNO3	-	-	600	-	-	-	-

تابع جدول (٧)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
Ca(NO3)2. 4H2O	1000	1000	-	-	-	-	-
NH4NO3	-	-	-	720	-	-	1650
(NH4)2 SO4	-	500	-	-	134	-	-
H2PO4 NH4	-	-	-	-	-	300	-
H2O NaH2PO4	-	-	125	-	150	-	-
KH2PO4	250	250	-	68	-	-	170
KCl	-	-	750	-	-	-	-
CaCl2.2H2O	-	-	75	220	150	200	440
MgSO4.7H2O	250	250	250	185	250	400	370

جدول (٨) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الصغرى (ملليجرام/ لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$FeCl_3 . 6H_2O$	-	-	1.0	-	-	-	
$FeSO_4 . 7H_2O$	-	-	-	27.8	27.8	15.0	27.8
$MnSO_4 . 4H_2O$	-	25.0	0.1	13.2	13.2	13.2	22.3

تابع جدول (٨)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$ZnSO_4 . 7H_2O$	-	7.5	1.0	2.0	2.0	1.0	8.6
H_3BO_3	-	-	1.0	3.0	3.0	5.0	6.2
KI	-	-	0.01	0.75	0.75	1.0	0.83
$CuSO_4 . 5H_2O$	-	-	0.03	0.025	0.025	0.2	0.025
$NaMoO_4$. 2H2O	-	-	-	0.25	0.25	0.1	0.25
$CoCl_2 . 6H_2O$	-	-	-	0.025	0.025	0.1	0.025
$NiCl_2 . 6H_2O$	-	-	0.03	-	-	-	-
$AlCl_3$	-	-	0.03	-	-	-	-
Na_2EDTA	-	-	-	37.3	37.3	20.0	37.3

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Héller, 1953. 4. Nitsch, 1972.
5. Gamborg, et al. (B5), 1976. 6. Schenk and Hildebrandt (SH), 1972.
7. Murashige and Skoog, (MS), 1962

جدول (٩) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الكبرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	MS mg/l	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
KNO_3	18.8	1900.0	25.0	2500.0	0.8	80.0
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	-	-	-	-	1.2	288.0

تابع جدول (٩)

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
H_4NO_3	20.0	1650.0	-	-	-	-
$NH_4)2SO_4$	-	-	1.0	134.0	-	-
$aH_2PO_4 . H_2O$	-	-	1.1	150.0	0.12	19.0
H_2PO_4	1.25	170.0	-	-	-	-
Cl	-	-	-	-	0.9	65.0
$aCl_2 . 2H_2O$	3.0	440.0	1.0	150.0	-	-
$gSO_4 . 7H_2O$	1.5	370.0	1.0	250.0	3.0	737.0
a_2SO_4	-	-	-	-	1.4	200.0

جدول (١٠) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الصغرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
$eSO_4 . 7H_2O$	100.0	27.8	100.0	27.8	-	-
$e_2(SO_4)_3$	0.1	-	-	-	6.3	2.5
$nSO_4 . H_2O$	-	-	60.0	10.0	-	-
$nSO_4 . 4H_2O$	100.0	22.3	-	-	29.8	6.55

تابع جدول (١٠)

Medium Component	MS mM	MS mM	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
$MnSO_4 . H_2O$	-	-	60.0	10.0	-	-
$ZnSO_4 . 7H_2O$	30.0	8.6	7.0	2.0	9.3	2.67
H_3BO_3	100.0	6.3	50.0	3.0	25.0	1.5
KI	5.0	0.83	4.5	0.75	4.5	0.75
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.1	0.025	0.1	0.025	0.004	0.001
Na_2EDTA	100.0	37.3	100.0	37.3	-	-
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	1.0	0.25	1.0	0.25	-	-
MoO_3	-	-	-	-	0.007	0.0001

الاحتياطات الواجبة عند تحضير البيئة

١- يجب أن تكون جميع المواد الداخلة فى تركيب البيئة الغذائية نقية، وتستخدم ملعقة نظيفة معقمة لكل مادة. ثم تعاد عبوات المركبات الكيميائية إلى أماكن حفظها بعد غلقها جيدا.

٢- توجد فى الأسواق بيئات غذائية جاهزة التحضير تحتوى على العناصر الكبرى والصغرى وحديد مخلبى. ويفضل استخدامها لأسباب اقتصادية وتوفيرا للوقت والمجهود.

٣- تحضر البيئة باستخدام المحاليل المركزة للعناصر الكبرى والعناصر الصغرى التى سبق تحضيرها. ويوزن الآجار والسكر عند الحاجة إليهما. وتحضر محاليل منظمات النمو والفيتامينات قبل الاستخدام مباشرة.

٤- قد تتكون رواسب بمحاليل العناصر الكبرى والصغرى أثناء التخزين حتى ولو كان التخزين باردا. وتسبب الرواسب مشاكل كثيرة. ومحاولة إعادة إذابتها بالحرارة أو الغليان قد يؤدى إلى تغيير تركيزها فى المحلول نتيجة فقد الماء بالبخر، وفى هذه الحالة يفضل التخلص منها وإعادة تحضيرها.

٥- يفضل معاملة البيئة الغذائية بالبخار بدلا من الغليان لإذابة الآجار، حيث إن المعاملة بالبخار تكون أكثر أمانا وتقلل من حدوث تحلل كيميائى غير مرغوب فيه.

٦- المواد التى تتأثر بالحرارة مثل الفيتامينات ومنظمات النمو تضاف بعد تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وتبريدها لدرجة حرارة ٤٥- ٥٠°م.، وتستخدم المرشحات المعقمة Filter-sterilization لتعقيمها.

٧- قد يضاف للبيئة الغذائية فحم نباتى نشط للاستفادة من قدرته على امتصاص الغازات السامة التى تتجمع حول جذور النباتات، على أن يضاف للبيئة قبل التسخين أو بعد التسخين مع التقليب الجيد حتى يتجانس تماما مع البيئة الغذائية. ثم تعقم البيئة فى الأوتوكلاف عند ١٢١°م و١,٥ ضغط جوى ولمدة ١٥- ٢٠ دقيقة.

٨- فى حالة الضرورة تخزن البيئة الغذائية بعد تحضيرها، مع مراعاة تجنب تخزينها لمدة طويلة للمحافظة على ثبات المركبات الكيميائية الداخلة فى تكوينها ومنع التبخير الشديد للماء منها.

٩- توزع البيئة فى الأوانى وهى دافئة ثم تترك للتجمد، مع مراعاة وضع أنابيب الاختبار فى وضع مائل حتى تتجمد البيئة. وتحفظ الأوانى المحتوية على بيئة غذائية عند ٥°م لحين زراعتها.

١٠- تغطى الأنابيب والدوارق بورق ألومنيوم بعد صب البيئة الغذائية فيها.

غلق الأوانى بعد زراعتها

تغلق الأوعية بعد زراعتها لمنع تلوثها وجفافها، مع المحافظة على سهولة تبادل الغازات داخل الوعاء مع الجو الخارجى، وتجنب نقص الأكسيجين ومنع تراكم

غازات ثانى أكسيد الكربون والإيثلين داخلها. ويجب أن تتوفر هذه المواصفات فى جميع أغطية الأنابيب والدوارق. ويستخدم فى غلق أوانى الزراعة المعملية ما يلى:

١- سدادات قطن صوفى Cotton wool وهى تستخدم بكثرة ويتم تشكيلها يدويا، ولها أهميتها فى المعامل التجارية. وتوجد ماكينات لتشكيل هذه السدادات بالحجم والمواصفات المطلوبة. ويجب ألاً تتعرض هذه السدادات إلى اللهب بعد الحقن لأن الصوف الزجاجى الصناعى يعطى عند حرقه مواد ضارة وخطيرة.

٢- سدادات Steristop مسامية يمكن دفعها داخل الأنبوبة.

٣- غطاء ألومنيوم Aluminum cap يثبت على فوهة الإناء بكلبس.

٤- ورق الومنيوم Aluminum foil يستخدم خاصة للدوارق المخروطية الكبيرة.

٥- غطاء من الزجاج الشفاف Transparent glass تمتاز بإعادة تعقيمها.

٦- غطاء حلزونى Screw cap يستخدم لتغطية الأنابيب والدوارق ذات الفوهة الحلزونية. وعند استخدامها يجب ألَّا تكون محكمة الغلق حتى لا تمنع تبادل الغازات بين داخل الأنبوبة وخارجها.

٧- سدادات فوم Foam plugs.

٨- شرائح فيتا فيلم Vita film رقيقة وأنواع أخرى مثل Para film; Polypro-pylcne film; PVC plastic film، ويجب أن تسمح هذه المواد بتبادل الغازات ولا تسمح بخروج بخار الماء.

احتياطات غلق الأوانى بعد زراعتها

١- يؤدى الغلق المحكم إلى تجمع ثانى أكسيد الكربون والإيثلين داخل أوانى الزراعة ويمنع تبادل هذه الغازات بالهواء الجوى. وزيادة تركيز هذه الغازات داخل الأوانى له تأثير سام على النموات بداخلها. والأغطية المصنوعة من ورق (الألومنيوم+ البولىبروبلين Polypropylene) لها مضارها حيث إنها غير منفذة للغازات، بينما الأغطية المصنوعة من البولى بروبولين نفاذة للغازات ولا تنفذ بخار الماء.

٢- تعتبر الأنابيب والصناديق والأغطية البلاستيكية مصدرا لغاز الإيثلين خصوصا إذا كانت محكمة الغلق.

٣- تؤدى زيادة الرطوبة داخل الأوانى المزروعة إلى ظهور ظاهرة التزجج Vertification.

٤- الأغطية الزجاجية وغيرها من الأغطية الصناعية الشفافة تسمح بنفاذ الضوء من أعلى، بينما الأغطية القطنية وأوراق الألومنيوم غير منفذة للضوء.

تقدير تركيز مكونات البيئة الغذائية

يقدر تركيز المواد الداخلة فى مكونات البيئة الغذائية بطرق عديدة منها:

١- النسبة بالحجم Volume percentage وتستخدم عادة عند استخدام محاليل طبيعية مثل ماء جوز الهند وعصير الطماطم، ويحضر ماء جوز الهند بمعدل ٥٠ ملليلتر + ٩٥٠ ملليلتر ماء مقطر.

٢- النسبة بالوزن Weight percentage وتستخدم عادة عند تحضير الآجار والسكريات والأملاح المعدنية. ويتم تحضيرها بإذابة الوزن المطلوب بالجرام من المادة فى حجم معلوم من البيئة الغذائية.

٣- المولر Molar ويستخدم التركيز بالمولر عادة عند تحضير منظمات النمو. والمول الواحد يساوى الوزن الجزيئى للمركب مقدرا بالجرام. والمولر يساوى واحد مول من المادة مذابة فى لتر. فمثلا:

(أ) طريقة حساب المولر للأكسين IAA.

واحد مولر لمركب IAA = الوزن الجزيئى بالجرام/ لتر = ١٧٥,١٨ جرام/ لتر.

واحد ملليمولر (mM) IAA = ٠,١٧٥١٨ جرام/ لتر.

واحد ميكرومولر (µM) IAA = ٠,٠٠٠١٧٥١٨ جرام/ لتر = ٠,١٧٥١٨ ملليجرام/ لتر.

(ب) طريقة حساب المولر لمركب كلوريد الكالسيوم $CaCl_2 . 2H_2O$

يحسب الوزن الجزيئ لمركب $CaCl_2 .2H_2O$، وذلك بجمع الأوزان الذرية للعناصر الداخلة فى المركب:

$O + 2H_2 + Cl_2 + Ca$

الوزن الجزيئ= ٤٠,٠٨+ ٢× ٣٥,٤٥٣+ ٤× ١,٠٠٨+ ٢×١٦,٠٠= ١٤٧,٠١٨

واحد مولر $CaCl_2 .2H_2O$= الوزن الجزيئ بالجرام/ لتر= ١٤٧,٠١٨ جرام/ لتر.

واحد ملليمولر $CaCl_2 .2H_2O$ (mM) = ٠,١٤٧٠١٨ جرام/ لتر.

واحـــد ميكرومولــر IAA (μM) = ٠,٠٠٠١٤٧٠١٨ جرام/ لــتر = ٠,١٤٧٠١٨ ملليجرام/لتر.

٤- ملليجـــرام/ لتر Milligram/ L ($mg\ l^{-1}$) ويســتخدم هـــذا المعيار عند تحضير منظمات النمو فمثلا:

10^{-6} = واحد ملليجرام/ لتر و10^{-7} = ٠,١ ملليجرام/ لتر.

٥- ميكروجرام/ لتر microgram/ L ($1\ \mu g^{-1}$)

واحد ميكروجرام/ لتر يساوى ٠,٠٠١ ملليجرام/ لتر.

٦- جزء فى المليون(Part per million (PPM.

جزء واحد فى المليون يساوى واحد ملليجرام/ لتر.

10^{-6}= ملليجرام / لتر($mg\ l^{-1}$) و10^{-3}= ٠,١ جرام/ لتر ($g\ l^{-1}$)

ويفضـــل اســـتخدام المولر فى مجال فســـيولوجيا النبات، فمثـــلا يصعب مقارنة النشـــاط الفسيولوجى لتركيز واحد ملليجرام IAA/ لتر مع ملليجرام واحد IBA/ لتر لاختلافهمـــا فى عدد الجزيئات فى اللتر. بينما مقارنـــة ميكرومولر واحد IAA مع ميكرومولر واحد IBA يكون مقبولا لاحتواء المحلولين على نفس العدد من جزيئات المادتـــين. ومســـجل فى الجداول التالية الـــوزن الذرى للعناصـــر الداخلة فى البيئة (جـــدول ١١)، والأوزان الجزيئية لمركبـــات العناصر الكبرى والصغرى (جدول ١٢) والسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى (جدول ١٣) والأكسينات والسيتوكينينات والجبرلين (جدول ١٤).

جدول (١١) الأوزان الذرية للعناصر الداخلة فى البيئات الغذائية

Element	Atomic Weight	Element	Atomic Weight
Aluminium (Al)	26.98	Manganese Mn	54.94
Boron (B)	10.82	Molybdenum (Mo)	95.95
Calcium (Ca)	40.08	Nickel (Ni)	58.71
Carbon (C)	12.011	Nitrogen (N)	14.008
Chloride (Cl)	35.457	Oxygen (O)	16.00
Cobalt (Co)	58.94	Phosphorus (P)	30.975
Copper (Cu)	63.54	Potassium (K)	39.10
Hydrogen (H)	1.008	Sodium (Na)	22.991
Iodine (I)	126.91	Sulphur (S)	32.066
Iron (Fe)	55.85	Zinc (Zn)	65.38
Magnesium (Mg)	24.32	-	-

جدول (١٢) الأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى للبيئة الغذائية

Compound		Atomic Weight
1- Macro-elements		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_4SO_4$	132.15

تابع جدول (۱۲)

Compound		Atomic Weight
Calcium chloride	$CaCl_3,2H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NH_3)_2.4H_2O$	236.1
Magnesium sulphate	$MgSO_4.7H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCL	74.55
Potassium nitrate	KNO3	101.11
Ptassium dihydrogen Orthophosphate	KH_3PO_4	136.09
Sodium dihydrogen Orthophosphate	$NaH_2PO_4.2H_2O$	156.01
2- Microelements		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCl_3.6H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4.4H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H_2O$	287.54

تابع جدول (١٢)

Compound		Atomic Weight
Sodium EDTA	Na_2-EDTA	372.25
Ferrous sulphate	$FeSO_4.7H_2O$	278.03
Ferric-sodium EDTA	FeNaEDTA	367.07

جدول (١٣) الأوزان الجزيئية للسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى

Compound	Molecular Weight
1 - Sugers and Alcoholic sugars	
Fructose ($C_6H_{12}O_6$)	180.15
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	180,15
Manitol ($C_6H_{14}O_6$)	182.17
Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$)	182,17
Sucrose ($C_{12}H_{11}O_{12}$)	342,31
2- Vitamins	
Ascorbic acid (Vit. C)	176,12
Biotin (Vit. H)	244,31
Calcium pantothenate (Ca salt of Vit. B1)	476,63
Cyanocobalamine (Vit. B1)	1357,64

تابع جدول (١٣)

Compound	Molecular Weight
L-Cystein HCL	157,63
Folic acid	441,40
Inositol	180,16
Nicotinic acid Or Niacin (Vit.B3)	123,11
Pyridoxine HCL (Vit. B4)	205,64
Thiamine HCL (Vit. B1)	337,29
Glycine	75,07
L - Glutamine	146,15
3- Other compounds	
Abscissic acid	264,31
Colchicine	399,43
Phloroglucinol	126,11

جدول (١٤) الوزن الجزيئى للأكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
1- Auxins	
p-Chlorophenoxy Acetic Acid (p-CAA)	186.59

تابع جدول (١٤)

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
2,4-Dichloro Acetic Acid (2,4-D)	221.04
Indole 3-Acetic Acid (IAA)	175.18
3-Indole Butyric Acid (IBA)	203.23
-Naphthalene Acetic Acid (NAA)	186.20
ß-Naphoxy Acetic Acid (NOA)	202.20
2- Cytokinins / Purins	
Adenine (AD)	189.13
Adenine sulphate (ADSO4)	404.37
G-Bezyl Adenine (BA) or 6- Benzyl Amino Purin (BAP)	225.20
N-Isopentenyl Amino Purine (2-ip)	203.3
6- Furfurylamine purine (Kinetin)	215.21
6-Benzylamino –9-Tetra-hydropyranyl-H-purine	309.40
6-(4 Hydroxy-3-Methylbut-2-enylamino) purine	219.20
3- Gibberellin	
Gibberellic Acid (GA3)	346.37

الباب الخامس

إنتاج الكالس Callus induction

يؤدى إحداث جرح في أى عضو نباتى إلى تنشيط الخلايا عند السطح المجروح والخلايا المجاورة لها وتنقسم وتكون كتلة خلوية تسمى بالكالس تعمل على التئام الجرح. ويعتبر الكالس بأنه كتلة من خلايا غير محددة أو مميزة المعالم له القدرة على الانقسام السريع. وينتج الكالس بسهولة فى المعمل من أى نسيج نباتى يزرع على بيئة مناسبة. ويمكن اكثاره بتجزئته وزراعة الأجزاء على بيئة مناسبة تحتوى على أملاح معدنية وفيتامينات ومنظمات نمو ومصدر كربونى (سكروز).

سرعة نمو الكالس فى البيئة السائلة

بعد زراعة خلايا الكالس فى بيئة سائلة تبدأ مرحلة يتوقف فيها النمو لفترة محدودة. بعدها تبدأ الخلايا فى الانقسام السريع، ويزداد عددها وحجمها حتى تصل إلى مرحلة الثبات العددى، وهى مرحلة تصل فيها كثافة الخلايا حدها الأقصى ثم تنخفض سرعة الانقسام حتى تتوقف تماما نتيجة زيادة عدد الخلايا واستنزاف واحد أو أكثر من العناصر المكونة لمعلق الخلايا. وفى هذه المرحلة تكون الخلايا سابحة فى البيئة مفردة أو متجمعة أو خليط منهما. فمثلا كالس نبات *Anthurium andreanum* ينمو فى صورة خلايا متكتلة Clumps. بينما كالس الجزر يتفكك بسهولة إلى خلايا فردية أو متجمعة. فإذا كان النمو الناتج ضعيفا فقد يكون سببه ضعف الجزء النباتى، لذلك يفضل زراعة جزء نباتىآخر تحت نفس ظروف التحضين مع تخفيض تركيز منظمات النمو فى البيئة. فإذا كان نمو الكالس مازال

ضعيفا، فهذا دليل على أن البيئة المستخدمة غير مناسبة، لذلك يفضل إضافة بعض المعقدات الأخرى للبيئة مثل لبن جوز الهند وكازين ومستخلص الشعير النابت ومستخلص الخميرة وغيرها. ويختلف لون وتركيب وطريقة نمو الكالس باختلاف الأنواع النباتية. فقد يكون لونه أبيض أو ملونا، وقد يكون هشا أو متماسكا، وقد يكون طريا (مائيا) أو صلبا، وقد يكون سهل أو صعب التفكك إلى خلايا. وقد تحدث طفرات فى الخلايا الداخلية للكالس. وقد يفقد الكالس احتياجه من الأكسين و/ أو السيتوكاينين بعد تكرار الزراعة المعملية ويكون قادرا على الاكتفاء الذاتى بما يحتويه من منظمات النمو.

إنتاج كالس نبات التبغ Tobacco

١- إنتاج كالس من ساق التبغ

١- تفصل قطع بطول ٣سم تقريبا من ساق حديثة لنبات جيد النمو خالى من الآفات. وتغمس نهايات القطع فى شمع بارافين سائل لتغطيتها وحمايتها أثناء عمليات التعقيم المتتالية.

٢- ينظف السطح الخارجى للقطع الساقية ويزال شمع البارافين من عليها مع الاحتفاظ بوجوده على الأسطح المجروحة فقط. ثم تعقم بغمسها فى ٧٠٪ كحول إيثانول لمدة ٢٠- ٣٠ ثانية، يتبعه تعقيما كاملا فى محلول هيبوكلوريت الصوديوم (تركيز الكلور ٢٪ تقريبا). ويمكن استخدام بعض المعقمات الأخرى مثل Calcium hypochlorite; Mercuric chloride; Bromine water. ويوصى بإضافة ١- ٢ نقطة من أحد مركبات التخلص من التوتر السطحى Surfactants مثل Tween- 80 إلى محلول التعقيم لتحسين انتشاره.

٣- تشطف القطع الساقية ٥- ٦ مرات فى ماء مقطر معقم، ثم تقطع إلى أقراص بسمك ٢- ٣ ملليمتر، مع استبعاد النهايات المجروحة المغطاة بالبرافين. ويوضع كل قرص أفقيا على بيئة (MS) صلبة تحتوى على ٣٠ جرام سكروز/ لتر + ملليجرام واحد -2,4

D/ لتر + ٠,٢ ملليجرام/ لتر كاينيتين. ثم تحضن عند ٢٤- ٢٨°م وضوء فلوروسنت. وبعد ١- ٣ أسابيع يبدأ تكوين الكالس بصورته البللورية. وبعد ٤- ٨ أسابيع يصبح حجم الكالس صالحا للتجزئة وإعادة زراعته فى بيئة مماثلة ولكنها طازجة لإكثاره.

٢- إنتاج كالس من ورق التبغ

تفصل ورقة حديثة العمر من نبات التبغ، ثم تعقم سطحيا وتقطع إلى أجزاء ويزرع كل جزء فى بيئة صلبة فى أنبوبة اختبار. فيتكون كالس فى مواقع الجروح على الأجزاء الورقية. وتجرى الزراعة الثانوية Sub-culturing إذا كانت هناك حاجة لزيادة كمية الكالس. فيجزأ الكالس بعد وصوله للحجم المناسب، ثم تزرع الأجزاء فى بيئة طازجة صلبة أو سائلة لتشجيعه على النمو. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات باستخدام بيئة طازجة. وبالفحص الميكروسكوبى يمكن ملاحظ وجود تجمعات خلوية أكبر حجما عن باقى خلايا الكالس. وظهور هذه التجمعات الخلوية بعد فترة قصيرة من زراعة الكالس يعنى ميله لتكوين أجنة ونموات جديدة مبكرا وهى ظاهرة غير مرغوبة لأنها تؤثر فى كمية الكالس الناتج. ويجب التخلص من هذه التجمعات الخلوية حتى يعود الكالس لنشاطه فى النمو والانقسام مع توفير البيئة الغذائية ومنظمات النمو المناسبة. وتظهر التجمعات الخلوية كبيرة الحجم إذا احتوى الجزء النباتى على خلايا برانشيمية، وتختفى إذا احتوى على خلايا مرستيمية.

العوامل المؤثرة فى تكوين الكالس

١- عمر الجزء النباتى

ينتج الكالس من زراعة أى جزء نباتى فى بيئة غذائية مناسبة. وتعتبر الخلايا أو الأنسجة المفصولة من نباتات حديثة العمر Juvenile أو من نباتات عشبية هى الأفضل فى إنتاج ونمو الكالس بالمقارنة بالأنسجة البالغة Adult. وأن الأجزاء الطرفية تحتوى على مستوى هرمونى أعلى من الأجزاء القاعدية والبالغة.

٢- نوع النبات

يمكن إنتاج الكالس بزراعة أى جزء نباتى مفصول من نباتات ذات فلقتين أو فلقة واحدة فى بيئة مناسبة. ويختلف الكالس فى تكوين نباتات باختلاف النوع النباتى ومحتوى البيئة الغذائية والبيئة المحيطة. فمثلا الأجزاء النباتية المفصولة من النوع *Anthurium andraeanum* لهـا القدرة على تكوين كالس وإنتاج نموات جديدة، بينما قدرة النوع Anthurium scherzerianum منخفضة (٧٥٪)، وهما نوعان يتبعان للجنس أنثوريـوم Anthurium. كذلك يتكون الكالس من متوك الجارونيا Geranium بنسـبة ١٠– ٦٢ ٪. وتعتبر النباتات أحادية الفلقات Monocotyledons أقل إنتاجا للكالس بالمقارنـة بالنباتات ثنائية الفلقـات Dicotyledons. وفى حالة صعوبة إنتاج الكالس مـن نباتات أحادية الفلقات يفضل زراعة أجنة أو أوراق حديثة العمر أو بادرات أو أزهار حديثة جدا مع إضافة الأكسين للبيئة كمنشط لتكوين الكالس. وإنتاج الأجنة مـن الكالس قد يكون صعبا أو مسـتحيلا لبعض الأنـواع النباتية، وقد تتكون على الكالس أجنة عرضية تدخل فى سكون عميق يصعب انكساره. وتوجد ظواهر كثيرة يصعـب تعليلها مثل انخفاض أو فقد كامل لقدرة خلايا الكالس على النمو والتكاثر بعـد عدة مرات مـن الزراعة الثانوية، أو تكوين نبتات مباشـرة بدون تكوين أجنة عرضية. وقد يكون لمنظمات النمو دور رئيسـى فى نمو وتكاثر بعض الأنواع النباتية بينما البعض الآخر قد يبدأ فى التكاثر الخضرى تلقائيا فى غياب منظمات النمو.

٣ – صورة البيئة الغذائية

تنجـح زراعـة الكالس فى بيئة صلبة أو سـائلة، إلا إن نموه أسـرع فى البيئة السـائلة لوجود تلامس مباشـر بين الخلايا والبيئة مما يزيد اسـتفادة الخلايا من مكونات البيئة. وهز الدوارق المحتوية على بيئة سـائلة باستخدام جهاز رج يساعد على سرعة نمو الكالس وتفكك خلاياه وزيادة مساحة الأسطح الملامسة للبيئة وإمداد الكالس بالأكسجين. وتساعد البيئة الصلبة على إنتاج نموات من الكالس مبكرا قبل

اكتمال نموه. ويفضل رج البيئة على هزاز دوار Rotary shaker بسـرعة ٨٠- ١٠٠ دورة/ الدقيقة، وقد تخفض سـرعته أحيانا إلى ٤٠ دورة/ الدقيقة وقد تزاد إلى ١٢٠ دورة/ الدقيقة. ويجب أن تحتوى الدوارق المخروطية ٢٠- ٣٠٪ من سعتها. ويفضل تخفيـض كمية البيئة الغذائية فيها إذا كانـت كمية الخلايا أو التجمعات الخلوية المزروعة فيها قليلة.

٤- البيئة الغذائية والبيئة المحيطة

تسـتخدم بيئة (MS) قبل أو بعد تطويرهـا لإنتاج الكالس على أن تحتوى على سـكروز أو جلوكـوز بنسـبة ٢- ٤٪ وقد يضـاف إلى البيئة الكازيـن Casein hydrolysate ومسـتخلص الشـعير النابت Malt extract والخمـيرة وماء جوز الهند. وتختلف الأكسـينات والسـيتوكينينات المضافة للبيئة من حيـث نوعها وتركيزها والنسـبة بينهما باختلاف نوع النبات والنمـط الوراثى ومحتوى الجزء النباتى من الهرمونات. ونسـبة الأكسين و/ أو السيتوكاينين لها أهمية فى إنتاج الكالس. فقد تحتـاج بعض النباتات إلى أكسـين فقـط مثل النباتات أحاديـة الفلقة وقد تحتاج البعض الآخر إلى سـيتوكاينين فقط، وقد يسـتلزم وجود الأكسـين + السيتوكاينين (Steward, et al., 1964).

ويسـتلزم لتكوين كالس بعض الأنواع النباتية توفير الضوء أو الظلام بما يتناسب ونوع النبات على أن تحضن عند ٢٢- ٢٨°م.

٥- الزراعة الثانوية

الكالس هو عبارة عن نسـيج سـريع النمو. وقد يفقد الكالس قدرته الذاتية على الانقسـام والنمو أثناء الزراعة الثانوية إذا اتجه إلى تكوين نبتات أو أجنة. ويجب ألَّا يضعف الكالس أو يفقد كفاءته فى التكاثر بتكرار الزراعة الثانوية لذلك تزال النموات الخضرية التى تتكون عليه مبكرا قبل أن يصل إلى الحجم المناسب للزراعة الثانوية.

٦ – ظهور طفرات وتغييرات وراثية ذاتيا

تتميز خلايا الكالس بســرعة انقسامها وسرعة تأثرها للتغييرات التى تحدث فى مكونــات البيئة الغذائية والظــروف البيئية المحيطة. وينتج عــن ذلك عدم انتظام انقسام خلايا الكالس وحدوث اضطرابات فى توزيع الكروموسومات والجينات أثناء انقســام الخلايا. ويؤثر ذلك بوضوح على شــكل ولون الكالس وتكوين الأجنة منه. لذلك تســتبعد خلايا الكالس التى حدثت بها تغييرات وراثية شاذة. وقد يهتم بها مســتحدثو الطفــرات. وجدول (١) يبين بعض التغييرات فى عدد الكروموســومات بخلايا كالس نباتات الذرة الأحادية Haploid الناميةفى بيئة مضافا إليها أكســين وسيتوكاينين (Kochhar, et al., 1971).

جدول (١) تباين عدد الكروموسومات فى كالس ونباتات الذرة *

Ploidy level	Callus		Plants*	
	No. of cells	%	No. of cells	%
Hypohaploid (> 10)	34.0	7.9	25.0	3.9
Haploid (= 10)	383.0	89.7	564.0	87.4
Hypodiploid (> 20)	2.0	0.2	10.0	1.6
Diploid (= 20)	8.0	1.9	46.0	7.1
Total	427.0	99.7	645.0	100.0

* عدد النباتات المختبرة ٣٥ نبات

ظاهرة التزجج Vertification

هى ظاهرة فســيولوجية تصيب الكالس حيث يتحول مظهره إلى ما يشبه الزجاج. ويطلــق على هذه الظاهرة أسماء عدة مثــل Glassiness; Glauciness; Translucency;

Waterlogging; Hyperhydration Hyperhydric transformation. ويحـــدث التزجـــج أضـــرارا كثيرة للكالس مثل عدم اســـتكمال نموه وميلـــه إلى تكوين نبتات مبكرة عليها جـــذور. وقد تحقق ذلك فى كالـــس أنواع وأصناف عديدة تابعـــة للأجناس *Prunus Malus* والقرنفل والخرشـــوف. ومن العوامل المساعدة على ظهور التزجج ارتفاع نسبة الرطوبة فى البيئة الغذائية مثل البيئة السائلة. وزيادة نسبة الرطوبة الذاتية فى خلايا الجزء النباتى مثل تلك المفصولة من نباتات غضة حديثة العمر. واستخدام بيئات غنية فـــى الأملاح المعدنية مثل بيئـــة (MS). وانخفاض أو عدم وجود الآجار. وبعض أنواع الآجار قد تكون سببا فى ظهور التزجج. وانخفاض الضوء، وارتفاع الحرارة، والتعقيم الشـــديد. ويمكن منع أو تقليل التزجج باســـتبدال بيئـــة (MS) الغنية بالأملاح ببيئة Lepoivre عند زراعة أجزاء مفصولة من نباتات *Prunus Malus;* أو تســـتخدم بيئات ثنائية المظهر (2-Phase media) أو تحسين تبادل الغازات فى الأوعية المنزرعة.

تكشف الأجنة الجسمية من الكالس

تنتج الأجنة الجســـمية بزراعة خلايا أو أجزاء نباتية زراعة معملية ويطلق على هذه الأجنة بأنها أجنة خضرية أو عرضية أو لا جنســـية. بينما الأجنة الجنســـية هى أجنة ناتجـــة من التلقيح والإخصاب وتفصل من البذور. وعلى ذلك فإن النباتات الناتجة من أجنة جســـمية نـــوع من أنواع التكاثر الخضرى وهى امتـــداد لصفات نبات الأم . وعند التكشف تتحول بعض خلايا الكالس إلى أجنة جسمية Somatic embryogenesis ممتلئة بسيتوبلازم كثيف. ثم تتحول إلى براعم جسمية تحتوى خلاياها على فجوات عصيرية صغيرة الحجم. وتنمو البراعم لتكون نبتات. وينشـــأ الجنين الجسمى من خلية فردية، ثم تنقســـم هذه الخلية وتكون ما يشبه الجنين الأولى Pro-embryo-like فى صورة عقدة Nodular أو نسيج متكتل يشبه البرعم Bud-like. وقد ينشأ الجنين الجسمى من خلايا داخليـــة فى كتلة خلايا الكالس Endogenously أو من خلايا ســـطحية Exogenously وتسمى أجنة عرضية. وتتكشف الأجنة بإحدى الطريقتين (Ammirato, 1983):

١- تكشف مباشر Direct differentiation

يتكون الجنين فى هذه الحالة من خلية أو عدة خلايا من الجزء النباتى مباشرة بدون الدخول فى مرحلة تكوين الكالس. وتسمى الخلايا التى ينشأ منها الجنين باسم Pro-embryonic determined cells (PEDCs). وفصل جزء من هذا الجنين وزراعته يؤدى إلى تحديث كامل له. ومن أمثلة ذلك زراعة أجزاء مفصولة من نسيج النيوسيلة Nucellus tissue الموجود فى بعض أنواع الموالح والمانجو التى تتميز بظاهرة تعدد الأجنة Polyembryony وخلايا الإبيدرم Epidermal cells للسويقة الجنينية لنباتات الجزر البرى و*Ranunculus scelratus* و*Linum usitatissimum* و*Brassica napus*.

٢- تكشف غير مباشر Indirect differentiation

يعنى ذلك إنتاج الأجنة من الكالس. وفى هذه الحالة يزرع الجزء النباتى فى بيئة سائلة لتكوين معلق خلايا. وتلقى هذه الطريقة اهتماما كبيرا فى المجال التجارى لكثرة عدد الأجنة الجسمية الناتجة . ويزرع أعداد كبيرة من الخلايا الجسمية فى أحجام صغيرة من البيئة السائلة. ويمكن إنتاج حوالى١٠° أجنة جسمية من كل جرام واحد من النسيج. ويستلزم التخلص من الخلايا والأجنة المتكشفة مبكرا بهدف تشجيع الكالس على الاستمرار فى النمو والانقسام لإكثار كميته. وقد أمكن بهذه الطريقة إنتاج أجنة جسمية من نسيج اللحاء الثانوى Secondary phloem للجزر وأجزاء مفصولة من ورقة نبات البن العربى *Coffea arabica* والبيتونيا *Petunia hybrida* والأسبرجس *Asparagus officinalis*.

البيئة الغذائية المناسبة لإنتاج أجنة جسمية

١– من الواضح الآن أن الكالس قادر على تكوين أجنة جسمية تتكشف إلى سوق وجذورعرضية. ويرتبط تطور الجنين الجسمى بوجود الأكسين والسيتوكينين

فى البيئة الغذائية، حيث تتكون نموات خضرية من نسـيج الكالس إذا توفر تركيز منخفض من الأكسين وتركيز مرتفع من السيتوكاينين. ويعتبر مركب (BA) هو أكثر السـيتوكاينينات المنشـطة لتكوين أفرع عرضية. كذلك التركيـز المرتفع من العناصر الغذائية فى البيئة يسـاعد على إنتاج أفرع عرضية. وقد تتكون الجذور العرضية فى بعض الحالات عند قاعدة الأفرع العرضية. وتتكون منشـئات الجذور Root primor-dial عادة فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسـبيا من الأكسـين وتركيز منخفض من السيتوكاينين. بينما تحتاج لنموها إلى تركيز أكثر ارتفاعا من الأكسين. وقد تنمو الجذور والسوق من الكالس فى وقت واحد دون الارتباط ببعضهما.

٢- إمـداد البيئة الغذائية بالأكسـين له أهمية لمعظم النباتـات للبدء فى تكوين الأجنة. وغالبا التركيز المرتفع من الأكسـين يكون مطلوبا لتكوين الأجنة، والتركيز المنخفض من الأكسـين لازما لتنشـيط نمو الأجنة بعد تكوينها، وغياب الأكسـين يؤدى إلى إنضاج مبكر للجنين. وقد لا يستلزم إضافة الأكسين إلى بيئة بعض الأنواع النباتيـة. وللأكسـين 2,4- D أهمية كبيرة فى تكوين أجنة النباتات العشـبية مثل النجيليات. بينما ليس للسـيتوكاينينات دور هام فى هذا الشـأن. ويمنع الجبريلين والإيثلين تكوين الأجنة.

٣- يسـاعد ارتفاع تركيز الأمونيوم على نمو السوق والجذور، وإمداد البيئة الغذائية بالنيتروجين المختزل فى صورة أيونات أمونيوم له أهمية للزراعات المعملية. فالنيتروجين المختـزل (مثل أمـلاح الأمونيا) أو لبن جوز الهند أو الكازيـن Casein hydrolysate أو الأحماض الأمينية مثل L- Glutamine وL- Alanine قد يكون لها أهمية فى تنشـيط وتكوين الأجنة. وأوضح Pierik and Steegmans, 1976 أن تخفيض تركيز الأمونيوم فى حالة نبات *Anthurium andrcanum* ينشط تكوين الأفرع العرضية على نسيج الكالس.

٤- البوتاسـيوم ينشط تكوين الأجنة، والتركيز المرتفع من الكالسيوم يثبط تكوين الأجنة.

٥- ينشط الضوء عموما تكوين الأجنة، بالرغم من أنه يمكن تكوين الأجنة لبعض الأنواع النباتية فى ظروف شـدة ضوء منخفضة أو فى ظلام. والحرارة المرتفعة عادة

مرغوبة لتكوين الأجنة. وتحتاج زراعة المتوك لبعض النباتات إلى صدمة باردة Cold shock لتنشيط تكوين الأجنة ونموها.

٦- التركيز الأمثل للسكروز هو ٢- ٣٪ تقريبا.

٧- حمض الأبسيسـيك Abscisic acid يتكون طبيعيا فى النبات وله تأثير مثبط للنمو، إلا إن له بعض التأثيرات الواضحة على نمو الأجنة فى المزارع المعلقة. فمثلا بعد زراعة الخلايا فى بيئة سائلة لوحظ وجود اختلافات فى نمو وتطور التجمعات الخلوية الناتجة ما بين تجمعات صغيرة وكبيرة من الخلايا المرستيمية وخلايا مهيأة لتكوين أجنة مبكرة بجانب خلايا عادية. ويعنى ذلك عدم تجانس الخلايا فى معلق الخلايا. وإضافة حمض الأبسيسك كان له تأثير واضح على خفض هذه الاختلافات فى نمو الخلايا وجعل الأجنة تتطور طبيعيا.



الباب السادس

إنتاج نباتات خالية من الأمراض

أ- إنتاج نباتات خالية من الفيروسات

تسـبب الفيروســات أمراضا كثيرة مثل موزايك البطاطس Potato mosaic وتورد القمة فى الموز Banana-Bunchy Top Virus وموزايك قصب السـكر Sugar can mosaic وقوباء المـوالح Citrus psorosis والتدهـور السـريع فى المـوالح Citrus tristeza وموزايك التبغ Tobacco mosaic. وتسـبب الأمراض الفيروسـية خسـائر فادحة فـى النباتات، فمثلا تسـبب فيروسـات (V . Y) مرض التفـاف الأوراق فى البطاطس وفقـد ٣٠٪ تقريبا من المحصـول العالمى من الدرنات، وانتقالها من جيل إلى جيل يؤدى إلى تدهور خطير فى محصول الدرنات يصل إلى ٥٠–٨٠ ٪. لذلك أصبح من أهداف الزراعة المعملية الحصول علـى نباتـات خالية من الفيروسـات. واهتمـت دول كثيرة بإنتاج بطاطـس خالية من الأمراض الفيروسية باستخدام زراعة الأنسجة. وواكب ذلك ارتفاع متوسط المحصول من ١١طنـا إلى ٢٠طنا بالهكتـار فى الفترة ١٩٧٠– ١٩٨٨. وتبنت دول كثيرة تطبيق زراعة الأنسـجة مثل الدنمارك (١٩٨٥) والسويد (١٩٨٥) والمكسيك (١٩٨٧) وكوبا (١٩٩٢). ويوجد الآن على الأقل ١٣٦ صنفا تجاريا من البطاطس خالية من الإصابة الفيروسـية، بالإضافة إلى أصول مرجعية خالية من الأمراض لبعض المحاصيل الحقلية والبسـتانية، كذلك تم تحديث أصناف قديمة من البطاطس وغيرها من المحاصيل التى تتميز بارتفاع المحصـول والتبكير فى النضـج. واصطلاح «خالى من الفيروس» Virus free هو اصطلاح غير دقيق لعدم وجود نباتات خالية من جميع الفيروسات. ولكن توجد نباتات خالية من بعض الفيروسـات دون غيرها. وسوف يستخدم الاصطلاح «Virus free» فى هذا العرض للتعبير عن نباتات خالية من فيروسات معروفة ومحددة بواسطة الأجهزة العلمية.

طريقة دخول الفيروس فى النبات

تدخل الفيروسات النبات من خلال الجروح. وتساعد الأدوات الزراعية والحشرات والقوارض والنيماتودا على انتشار الإصابة. ويخترق الفيروس أنسجة النبات ببطء حتى يصل إلى نسيج اللحاء الحامل للمواد الغذائية الممثـ" وينتقل الفيروس إلى أجزاء النبات المختلفة بسرعة انسياب تيار المواد الغذائية الحاملة له وفى الاتجاه الذى تنجذب إليه. فيتحرك معها إلى الجذر لأنه منطقة جذب قوية فى مرحلة البادرة. ثم ينتشر من الجذر إلى أعلى الأوراق الحديثة الملتفة التى تعتبر منطقة جذب أخرى حتى يكتمل تمددها وتصبح قادرة على بناء وتصدير المواد الممثلة بدلا من جذبها. وبتقدم عمر النبات تنجذب المواد الممثلة حاملة الفيروسات إلى مناطق التخزين مثل الدرنات والأبصال والثمار وغيرها، حيث تعتبر مناطق جذب أخرى (Sharabash, 1977; 1980 ; 1981 a,b).. وثبت أن تواجد الفيروسات يكون ضعيفا أو منعدما فى الطرف المرستيمى للقمم النامية. لذلك فإن دراسة حركة الفيروسات وسرعة انتشارها وأماكن تركيزها وعلاقة ذلك بنوع النبات ومراحل نموه لها أهمية عند اختيار حجم المرستيم المناسب للزراعة. ويختلف انتشار الفيروسات فى النباتات كالآتى:

- فيروسات تتحرك فى الخلايا الحية فقط.
- فيروسات تنتشر فى اللحاء فقط مثل فيروس تجعد الأوراق والتفاف الأوراق فى البطاطس.
- فيروسات تنتشر فى الخلايا البرانشيمية فقط مثل فيروس موزايك الخيار وفيروس تبرقش البطاطس. بالرغم أن سرعة تحرك الفيروسات منخفضة فى الخلايا البرانشيمية.
- فيروسات تنتشر فى الخلايا البرانشيمية واللحاء على السواء مثل فيروس موزايك التبغ.
- فيروسات تنتشر بصورة غير منتظمة فى أعضاء النبات المختلفة مثل فيروس تبرقش التبغ Tobacco Mosaic Virus (TMV).

– فيروسات تنتشر فى مساحات من ورقة النبات يفصلها مساحات بينية خالية من الفيروس مثل موزايك نباتات البيتونيا والكرنب والتبغ.

أعراض الإصابة الفيروسية

لا تدل أعراض الأمراض الفيروسية غالبا على الفيروس المسبب لها، فقد تتشابه وتتداخل بعض الفيروسات فى مظهر الإصابة. فمثلا تشترك فيروسات A, S, Y, X فى إظهار أعراض تبرقش أوراق البطاطس. وقد تظهر أعراض الإصابة الفيروسية على الأوراق على هيئة بقع صفراء أو خضراء باهته متبادلة مع مناطق خضراء داكنة (موزايك) كما فى البطاطس والفاصوليا والفلفل والقمح والقصب، أو فى صورة خطوط باهتة اللون Streak على أوراق القصب، أو اصفرار كما فى أوراق الخوخ. وقد تظهر الأعراض فى صورة التفاف أو تجعد الأوراق كما فى البطاطس والطماطم، أو تقزم للسوق كما فى القمح والشعير، أو تقرحات على السوق كما فى قوباء الموالح. وقد تظهر الأعراض على الأزهار مثل تدهور Breaking out أزهار التيولب وندوة البراعم Bud blight فى فول الصويا. وقد تظهر على الثمار على هيئة تبرقش كما فى موزايك الخيار.

الاحتياطات اللازمة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس

الأدوات المستخدمة فى التكاثر الخضرى هى المصدر الرئيسى للغالبية العظمى لعدوى وانتشار الفيروسات بين النباتات. ولوحظ أن ٨٠ نوعا من حوالى ٦٠٠ نوع من الفيروسات كانت البذور أحد مصادر العدوى. لذلك يستلزم قبل الدخول فى برنامج إنتاج نباتات خالية من الفيروسات أن يتوفر الآتى:

١– تكون نباتات الأم خالية من الإصابة الفيروسية، ويفضل تنميتها فى صوبة نظيفة خالية من الفيروسات ومحمية من مسببات الإصابة بالفيروسات مثل الحشرات الماصة والقوارض والنيماتودا.

٢- المحافظة على سلامة العينات النباتية والأدوات المستخدمة فى فصلها من نبات الأم والأدوات والأوانى المستخدمة فى الزراعة فهى جميعها مصدر لإعادة التلوث بالفيروس.

٣- الارتفاع بمستوى النظافة الشخصية للعاملين ونظافة ملابسهم وأحذيتهم.

٤- تكون جميع مراحل الزراعة المعملية تحت ظروف معقمة.

٥- المحافظة على النباتات الجديدة الناتجة فى المعمل ومنع إصابتها. وقد يستلزم إبقاء النباتات الخالية من الفيروسات نامية فى المعمل تحت ظروف بيئية نظيفة مع متابعتها وفحصها والكشف عليها للتأكد من سلامتها.

أهمية المرستيم فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس

المرستيمات التى تفصل من براعم طرفية أو قاعدية على فرع رئيسى أو جانبى جميعها مناسبة للزراعة المعملية. وتختلف نسبة النجاح باختلاف موقع البرعم وعمر الساق الحامل للبرعم إن كان حديثا أو معمرا. واستخدم المرستيم بنجاح فى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات من الداليا Dahlias والبطاطس وعديد من الأنواع النباتية مثل Carrots, Potatoes Raspberry, Cherry, Grapes, Tobacco, Trifolium, Lolium, Forsythia.. ومن الواضح أن للمرستيم أهميته فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس لكثير من الأنواع النباتية، ولم يكن له نفس الأهمية فى أنواع نباتية أخرى بسبب سهولة انتشار الفيروس فى جميع أنسجتها.

أسباب خلو المرستيم من الفيروسات

- يتكون المرستيم من خلايا نشطة وسريعة الانقسام. وهذه الخلايا لا تحتوى على مواد غذائية بالقدر المناسب لنشاط وانقسام الفيروس. وقد يكون ذلك سببا فى عدم وجود الفيروس فى النسيج المرستيمى. بينما الخلايا الواقعة أسفل المنطقة المرستيمية تكون بطيئة الانقسام قادرة على الزيادة فى الحجم والامتلاء بالمواد الغذائية. وعلى ذلك فإن الفيروس يزداد نشاطه ويتكاثر بسهولة فى الخلايا أسفل المنطقة المرستيمية.

– يساعد عدم اكتمال نمو اللحاء والخشب فى المرستيم على إعاقة انتقال الفيروس إليه (White, 1934a).

– غيــاب البلازمودزماتــا Plasmodesmata بــين خلايا المرســتيم، وهى أوعية تربط بين الخلايا غير المرســتيمية. وقد يكون ذلك ســببا فى غياب الفيروسات من المرستيم.

– قد يكون ارتفاع تركيز منظمات النمو فى الخلايا المرســتيمية ســببا فى تثبيط نشاط الفيروس وإعاقة حركته وقدرته على النفاذ. وقد يكون عدم توفر الإنزيمات فى الخلايا المرستيمية سببا فى وقف نشاط وتكاثر الفيروس.

– احتمــال وجود مثبطات نمو طبيعية فى الخلايا المرســتيمية تكون ســببا فى انخفاض تركيز الفيروس. وقد يكون ذلك سببا لخلو البذور من الفيروسات.

وبالرغم من هذه الآراء فإنها غير كافية لتعليل خلو مرستيمات بعض الأنواع النباتية دون غيرها من الفيروسات ووجود فيروسات فى بذور بعض الأنواع النباتية.

المعاملات المساعدة للتخلص من الفيروس

(أ) المعاملة الحرارية

هى وســيلة فعالة فى تثبيط نشاط العديد من الفيروسات المتماثلة فى الحجم Iso-metric viruses والمايكوبلازما ويجب اختيار درجة الحرارة المناســبة والمدة اللازمة لتثبيط حيوية الفيروس دون أن تؤثر على حيوية النبات.

١– معاملة المرستيم بالحرارة

تطبــق هــذه المعاملة إذا كانــت نباتات الأم مصابة بأكثر مــن فيروس. وفى هذه الحالة يفصل المرستيم ثم يحضن بعد زراعته مباشرة فى المعمل عند ٣٥– ٣٨°م لمدة ٥– ١٠ أسابيع. وتساعد هذه الطريقة بنجاح على التخلص أو خفض كثافة الفيروس فى البطاطس والكريزانثم والقرنفل والفراولة.

٢- معاملة النباتات بالحرارة

نظـرا لصعوبة الحصول على المرسـتيم أحيانا. لذلك تطبـق المعاملة الحرارية علـى النباتـات العملية لهـذه النباتات. وتعتـبر البراعم الإبطيـة أكثر الأجزاء اسـتجابة للمعاملة الحرارية. وقد ثبت نجـاح المعاملة الحرارية للنباتات المعملية عند ٣٠- ٣٨°م للتخلص من الفيروسـات والميكوبلازما التىتصيب بعض أشـجار الفاكهة وبعض المحاصيل مثل قصب السكر والكاسافا (Morel, 1964). وبالمعاملة الحراريـة أمكن التخلـص من فيروس تبرقش الخيـار Cucumber mosaic virus من الأفرع النامية بالمعمل كذلك أمكن التخلص من فيروسـات البطاطس بتخزين الدرنات عند ٣٧- ٣٨°م لمدة شـهر قبل فصل المرسـتيم منها لزراعته فى المعمل (Morel, 1964).

(ب) المعاملة بالمواد الكيميائية

انتشار الكائنات الدقيقة مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والفطر داخل أو بـين الخلايا يحول دون وصول المبيدات إليها والتخلص منها. وقد تضاف مركبات مثل Vidarabine; Virazole (Ribavirine) إلى البيئة الغذائية للمسـاعدة على تثبيط نمـو هذه الكائنات المرضة، ويؤخذ عليهـا ارتفاع ثمنها. وإضافة مركب Virazole (Ribavirine) لبيئـة نباتات الليلى Lily والتفاح يؤدى إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات. ويثبط مركب Vidarabine عملية التمثيل الضوئى Antimetabolites فى النبـات. كما أن إضافة المضادات الحيوية والمبيـدات البكتيرية مثل: Rifampicin, Penicilin- G, Oxytetracycline, Tetracycline, Streptomycin, Achromycin, Chloromycine, 8- Hydroxy quinoline, Gentamycin. للبيئـة غـير مرغوب فيه لعدم تأثيرها على الفيروسـات، وأن لها تأثيرا مثبطا فقط على البكتريا والفطريات العالقة على الأسطح الخارجية للجزء النباتى، وليس لها تأثير على الإصابة المنتشرة داخـل الخلايا أو بينها. وإضافـة المبيدات البكتيرية إلى المـزارع المعملية بالتركيز

المناســب لقتل البكتريا قد يكون له تأثير ســام للنباتات النامية، خصوصا المركبات التى لها تأثير ضار على الريبوســومات أو تكوين مركبات ســامة ناتجة من تفاعلها مع مكونات البيئــة الغذائية. ويؤدى التركيز العالى من المضادات الحيوية إلى تثبيط النمو واستحداث سلالات ميكروبية مقاومة لها.

طرق إنتاج نباتات خالية من الفيروس

ينتج الآن على الأقل ٦٥ نوعا نباتيا خاليا من الفيروس بزراعة القمم المرستيمية، بجانــب كثير من الأصــول المرجعية (نباتات أم) كمصدر خــالٍ من الأمراض لكثير من المحاصيل الحقلية والبســتانية. ويمكن اتباع إحدى الطرق الآتية لإنتاج نباتات خالية من الفيروس:

١- زراعة مرستيم Meristem culture مفصول من عقل طرفية لنبات الأم.

٢- زراعة مرستيم مفصول من نبتة معملية.

٣- زراعة كالس أو بروتوبلاست.

٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية Rootstocks خالية من الفيروس.

١- زراعة مرستيم طرفى من نبات الأم

تفصل عقل طرفية من نباتات الأم. ثم تنظف جيدا بالماء ثم تشــطف بالماء المقطر المعقــم. مع الحرص على تغلغل المــاء بين الأوراق. ثم تزال جميع الأوراق من العقل الطرفيــة بقــدر الإمكان. ثم تغمس لمدة قصيرة فى كحــول ٧٠٪ للتخلص من الهواء المتبقى بين قواعد الأوراق والأجزاء الأخرى.

تعقم العقل الطرفية ســطحيا بغمســها فى محلــول ١,٥٪ هيبوكلوريت صوديوم مضافا إليه ٠,٠٥٪ مادة ناشــرة مثل Tween-20 أو Teepol أو Trigetol ثم تشــطف جيدا فى ماء مقطر معقم. ثم يزال ما تبقى من أوراق صغيرة حول القمة المرســتيمية للعقل الطرفية، ويتم ذلك تحت ميكروسكوب ضوئى .(X 40 –20)

تعقـم العقل الطرفية مرة ثانيــة فى محلول مخفف من هيبوكلوريت صوديوم، ثم تشــطف في ماء مقطر معقم. ويفضل الشــطف فى كحول ٧٠٪ ولا يفضل الشــطف بالماء، لأن وجود قطرات ماء لاصقة قد تســبب بعض المشــاكل أثناء فصل النســيج المرستيمى تحت الميكروسكوب.

تعــاد العقــل الطرفية مرة ثانية وتثبت تحت الميكروســكوب لإزالة الوريقات المتبقية حول المرســتيم واحدة بعد الأخرى. ويســتخدم سلاح شفرة حاد ومعقم. ويكــرر التعقيم أثناء هــذه الخطوة. وتتم تلك الخطوة والخطــوات التالية داخل كابينة معقمة.

يفصل الطرف المرســتيمى من القمة النامية بســلاح شــفرة معقم عندما تصبح خاليــة من الأوراق إلا من ١ - ٢ من منشــئات الأوراق المحيطة بها. ويســتخدم ميكروســكوب ومصدر ضوئى (فلوروسنت) أثناء فصل المرستيم. ويكون شكل القمة المرســتيمية على هيئة مكعب تقريبا، وقد يصل قطــره ٠,٢ ملليمتر وطوله ٠,٣- ٠,٥ ملليمتر تقريبا. ثم يزرع المرســتيم بعد فصله مباشــرة فى بيئة غذائية حتى لا يتعرض للجفاف.

ولتقييم كفاءة تعقيم الأجزاء النباتية، يضاف للبيئة ٢- ٣٪ تريبتون أو بيبتون، ثم تزرع فيها أجزاء نباتية معقمة بعد شــقها طوليا بحيث يكون الســطح المجروح ملامســا للبيئة. فــإذا ظهر بعد أيام قليلة من التحضين نمــوات لكائنات دقيقة فى البيئــة الغذائية يــدل ذلك علــى رداءة التعقيم. ونتائج هذه الطريقة غير مشــجعة عادة حيث لا توجد بيئة غذائية محددة يمكن اســتخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التى تنمو داخل الأنسجة.

عوامل انجاح المرستيم فى الزراعة المعملية

يجــب أن يكون محاطــا بواحدة أو اثنتــين من الوريقات الأولية (منشــئات الأوراق) للمحافظــة علــى رطوبته وحيويته. مع العلم بأن زيادة حجم المرســتيم

وزيــادة عدد الوريقات حوله يقلل كثــيرا من فرصة الحصول على نباتات خالية من الفيروس.

٢- تعتمد نسبة نجاح النباتات الخالية من الفيروس على الموسم الزراعى، حيث وجد أن تكوين الجذور على النموات الناتجة من المرســتيم المنزرع معمليا كان أفضل إذا فصل فى الربيع. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة للبطاطس والقرنفل.

البيئة المناسبة لزراعة المرستيم

يختلف كثــيرا المحتوى الكيميائى للبيئة المناســبة لزراعة المرســتيم باختلاف مرحلــة نموه، إن كانت لإنتــاج نبتات أو جذور وباختلاف النوع والصنف النباتى. لذلك يفضل الاستفادة من خبرة السابقين فى اختيار البيئة المناسبة أو يقوم الباحث بنفسه بتحديد البيئة المناسبة.

يزرع المرســتيم عادة فى بيئة صلبة وأحيانا فى بيئة ســائلة مع استخدام كبار ورقية لتثبيته. وتضبط الحموضة عند pH 5.4 - 6، ويضاف إليها السكروز بنسبة ٢- ٥٪ (وزن/ حجم) وبعض الفيتامينات مثل Vitamin-B1; Pyridoxin; Panthothenic; Nicotinic acid. وتضاف الأكســينات والســيتوكاينينات بتركيزات ٠,١- ٠,٥ ملليجــرام/ لتر لأهميتها فى تنشــيط انقســام الخلايا. ويضاف الجبرلين GA_3 أحيانا لتشــجيع استطالة الجذر. ويضاف الســيتوكاينينات أحيانا فى مرحلة متأخرة وليس بعد فصل المرســتيم مباشــرة لبعض النباتات مثل البلارجونيم Pelargonium لتلافى ظهور اللون البنى الذى تســببه السيتوكاينينات (Morel, 1964; Debergh and Maene, 1977).

الظروف البيئية المحيطة

تحضن المرســتيمات بعــد زراعتها عند ٢١-٢٥°م و١٤- ١٦ ســاعة يوميا ضوء فلوروسنت شدته ٨- ١٢ وات/ م٢. وتحتاج معظم نباتات الأبصال إلى حرارة أقل. وقد تســتخدم لمبات أقل قوة فى الأيام الأولى من زراعة المرســتيم (Debergh and Maene, 1977; Styer and Chin, 1983).

خطوات إنتاج نباتات خالية من الفيروس



c.f. Pierik,R.L.M. 1987

٢- زراعة مرستيم مفصول من نبات معملى

يستخدم المرستيم الطرفى المفصول من نباتات أو أبصال معملية أو أجنة ناتجة من نسيج النيوسيلة أو مرستيمات لبراعم زهرية لنبات القنبيط الناتج فى المعمل

لإنتـاج نباتات خالية من الفيروس، وقد ثبت نجاح هذه الطريقة فى الحصول على نباتـات تبغ وعنب وليلى وجلاديولس ومـوالح خالية من فيروس Tobacco mosaic virus (TMV) (Mori, et al, 1982).

٣ - زراعة كالس أو بروتوبلاست

يستطيع الكالس الهروب من الإصابة الفيروسية لسرعة انقسامه وعدم احتوائه على قـدر كافٍ من المواد الغذائية اللآزمة لنمـو وتكاثر الفيروس. وتكرار الزراعة الثانوية لكالس نبات التبغ والبطاطس يؤدى إلى إنتاج كالس خالٍ من فيروس البطاطس Potato X- virus. وأمكـن الحصـول على كالس ونبيتات خالية من الفيروس من زراعة متـوك نبات Pelargonium. وتم عزل بروتوبلاسـت من مناطق داكنة الاخضرار من أوراق نبات تبغ كانت مصابة بفيروس (TMV). ونتج عن هذا البروتوبلاست نباتات خاليـة مـن الفـيروس (Mori, et al., 1982). وفى الواقع أن إنتـاج نباتات خالية من الفيروس من الكالس والبروتوبلاسـت لها أهميـة عملية لمربى النباتات لحدوث تغييرات وراثية ونسبة إطفار عالية.

٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية خالية من الفيروس

يسـاعد التطعيم Micro-grafting على إنتـاج نباتات معملية خالية من الفيروس خصوصا للأنواع الخشبية التى يصعب عليها تكوين الجذور فى المعمل. ويتم التطعيم بنبتات معملية خالية من الفيروس على شـتلات أصول جذرية عمر ٢٠- ٤٠ يوما تعرضـت للحـرارة ٣٧- ٣٨°م. ويفضل ألا يزيد عمر شـتلات الأصول الجذرية عن بضعة أشـهر. ويمكن إكثار هذه النباتات مستقبلا بفصل براعم من النموات الجديدة ثم تطعم على شـتلات أصول جذرية خالية من الفيروس (Fridlund, 1980). وبهذه الطريقة تم الحصول على كرمات عنب خالية من الفيروس بعد تطعيمها على أصول جذرية عرضت لحرارة ٣٥°م لمدة ٢١ يوما، وتم بالتطعيم أيضا الحصول على نباتات

داليــا Dahlias خالية مــن الفيروس وذلك بتطعيم نبتات داليــا معملية بدون جذور وخالية من الفيروس على شــتلات داليا كاملة النمو وخالية أيضا من الفيروس. وإذا كانت نبتات الداليا المعملية متقدمة فى العمر ولم تتكون عليها جذور، فيمكن فصل عقل منها ثم تطعم على شــتلات خالية من الفيروس. فإذا تكشف منها غصن واحد خالٍ من الفيروس فيمكن تنشيط نمو البراعم الجانبية عليه والحصول منه على أفرع جديدة خالية من الفيروس. وبتكرار الزراعة المعملية للأفرع الجديدة يمكن الحصول علــى أعداد كثيرة منها يمكن اســتخدامها فى تطعيمات جديدة. وتنخفض نســبة نجاح المرســتيمات المطعمة على نباتات خالية من الفــيروس إذا أصيبت بالفيروس أو تعرضت للجفاف أو كانت البيئة الغذائية غير مناســبة أو كانت ساكنة (Morel, 1964). وبهــذه الطريقة تم إنتاج نباتات موالح ومشــمش وعنب وخوخ وتفاح وكافور وكاميليا خالية من الفيروس.

الكشف عن الفيروس Virus identification

١- استخدام نباتات اختبارية كاشفة Test plants

تستخدم نباتات كاشفة يظهر عليها بسهولة مظاهر الإصابة بالفيروس مثل *Chenopodium quinoa; Comphrena globosa; Chenopodium amaranticolor* وبعض أنــواع التبغ Tobacco. حيث تجمــع عصارة من النبات المراد اختباره، وتلوث بها ورقة على نبات كاشف بعد معاملتها بمسحوق Corborundum لإحداث جروح بها. ويحتاج هذا الاختبار فترة طويلة حتى تظهر أعراض الإصابة.

٢- استخدام الميكروسكوب الإلكترونى Electron microscope

يستلزم لهذه الطريقة توفير جهاز ميكروسكوب إلكترونى ومهارة من العاملين على استعمال الجهاز للكشف عن الفيروسات. ولهذا الجهاز كفاءة عالية فى التعرف إلى الإصابة الفيروسية حتى ولو كانت العينة النباتية منخفضة الإصابة بالفيروس.

٣- استخدام جهاز Immuno Capture Polymerase Chain Reduction (IC-PCR)

تعتبر من أكثر الطرق حساسية للكشف عن الكثافة العالية والمنخفضة للفيروس بالمقارنة بغيرها من الطرق الأخرى المستعملة مثل:

1.PCR = Polymerase Chain Reaction

2. DAS-ELISA= Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

3. IC-PCR = Immuno Capture – Polymerase Chain Reaction.

الكشف عن فيروس تورد القمة فى الموز

فيروس تورد القمة Banana Bunchy Top nanavirus (BBTV) من أخطر الأمراض التىتصيب الموز فى العالم. وينتشر فى لحاء النبات بتركيز منخفض، وحشرة المن *Pentalonia nigronervosa* من أهم الحشرات الناقلة للفيروس. وللكشف عن الفيروس تؤخذ عينة وزنها ٠,١ جرام من العِرق الوسط للورقة ثم تحفظ فى واحد ملليلتر منظم فوسفات ملحى Phosphate-buffer saline (PBS) يحتوى على ٠,٥ مولر فوسفات رقم حموضته ٧,٤ ومضاف إليه ٠,١٤ مولر كلوريد صوديوم. وثبت أن جهاز IC-PCR من أكثر الأجهزة حساسية للكشف عن الفيروس فى تركيزاته المرتفعة والمنخفضة فى عصارة العرق الوسط لنبات الموز بالمقارنة بغيره من الأجهزة مثل DAS-ELISA وPCR (Sadik, 1994).

(ب) إنتاج نباتات خالية من الفطريات

تنتشر جراثيم الفطر فى الهواء والتربة. وبسقوط جرثومة على بيئة مناسبة تمتص منها الماء وتنبت منها أنبوبة جرثومية. وتعتمد الجرثومة فى هذه المرحلة على ما يحتويه جسمها من مواد غذائية حتى تتمكن من العائل. وتعمل ممصاتها Appressorium على تثبيت الميسليوم أثناء نموه وانتشاره. وقد يخترق الميسليوم بشرة النبات مباشرة عن طريق الضغط الميكانيكى أو بإفراز الإنزيمات المحللة للجدار

الخلوى. وتستمر الأنبوبة الجرثومية فى نموها حتى تخترق فتحة ثغر ثم تنتشر بين خلاياه وترسل ممصاتها داخلها لتتناول غذاءها.

وتستخدم زراعة المرستيم بنجاح فى إنتاج نباتات خالية من بعض أنواع البكتيريا مثل *Xanthomonas; Bacillus; Pseudomonas; Erwinia.* وبعض أنواع الفطريات مثل Phialophora; Rhizoctonia; Verticillium; Fusarium. وإنتاج نباتات قرنفل خالية من فطر *Fusarium roseum f. cerialis* وفطريات *Fusarium oxysporum f.* dianthi; *Phialophora cinerescens* وبكتريا *Pseudomonas carophylli; Pectobacterium parthenii*. وبزراعة المرستيم يمكن إنتاج نباتات جلاديولس خالية من فطر *Fusarium oxysporum* f. gladioli وهو مرض خطير يصيب الجلاديولس، وإنتاج نباتات *Pelargonium* خالية من بكتريا *Xanthomonas pelagonii*، ونباتات بيجونيا *Begonia elatior* خالية من بكتريا *Xanthomonas begoniae*. ونباتات فراولة خالية من فطر *Phytophthora fragariae*.

درجات مقاومة النباتات للأمراض

١- نباتات منيعة Immune plants

نباتات لا تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض بالرغم من توفر الظروف الملائمة لنموه وانتشاره. ولا توجد نباتات منيعة ضد جميع الأمراض، بل قد يكون منيعا ضد مرض معين دون غيره.

٢- نباتات مقاومة Resistant plants

نباتات تظهر عليها أعراض الإصابة بدرجة محدودة ولا تؤثر على نموها وإنتاجيتها. وقد يرجع ذلك إلى:

- صغر حجم الثغور، وقدرة النبات على قفل الثغور بسرعة عند حدوث الإصابة، أو قدرة النبات على شغل غرفة الثغر بخلايا برانشيمية، أو سرعة التئام الجروح.

- وجود شعيرات أو طبقة سميكة من الكيوتين على أسطح النبات تعوق الأنبوبة الجرثومية من اختراق الأنسجة.
- وجود مواد كيميائية سامة تؤثر على نمو الميكروب وتوقف نموه.
- ارتفاع الضغط الأسموزى لبروتوبلاست النبات عن بروتوبلاست الميكروب فلا يستطيع الحصول على غذائه من خلايا النبات.
- عدم وجود مواد غذائية يحتاجها الميكروب مثل بعض الفيتامينات أو الأملاح فيتوقف نموه.
- عدم ملاءمة درجة حموضة البروتوبلاست لنمو الفطر.

٣- نباتات قابلة للإصابة (حساسة) Susceptible plants

نباتات تظهر عليها الإصابة بشدة وتؤثر على نموها وإنتاجيتها.

٤- نباتات شديدة القابلية للإصابة Very susceptible plants

نباتات تموت خلاياها بمجرد وصول ممصات الفطر إليها.



الباب السابع

إنتاج نباتات أحادية فى المعمل
In vitro Production of Haploids

الأعضاء المذكرة فى النبات

هى مجموعة من الأسدية Stamens موجودة فى الزهرة. وتتكون السداه من خيط Filament ومتــك Anther. ويتكـــون المتك من فصين كبيريـــن مفصولين من الداخل بحاجز. ويحتوى كل فص على حجرتين يفصلهما نسيج فاصل. ويحتوى كل فص على كيس جرثومى بداخله حبوب اللقاح. وجميع خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بــين حجــرات وجدر المتك هى خلايا جســمية ثنائية العدد الكروموســومى. بينما حبــوب اللقاح هى خلايا أحادية العدد الكروموســومى. وينتج عن الزراعة المعملية للمتــك نباتــات ثنائية مصدرها خلايا الأنســجة الضامة والقاصلــة بالمتك ونباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح. وتنشــأ حبوب اللقاح فى المتك من خلايا أمية Pol-len mother cells موجودة فى الطبقات الداخلية لجدر الأكياس الجرثومية. وتنقسم الخلية الأمية انقســاما اختزاليا Meiosis إلى خليتين أحاديتين Haploid، ويســمى دور الخليتين Dyad. ويتبع ذلك انقساما عاديا Mitosis ليكون أربع خلايا أحادية، ويســمى دور الأربــع Tetrad. وبذلك ينتج عن كل خلية أميــة واحدة أربع حبوب لقــاح. ثم تتفكك خلايا حبوب اللقاح (Pollen grains (Microspores جاهزة للتلقيح والإخصــاب. وحبة اللقاح خليــة كروية أو بيضاوية أو مضلعة لونها أصفر غالبا لها جــدار خارجــى عادة سميك عليه تجاعيد وأشــواك مميزة لكل نــوع نباتى. وحبة اللقــاح بداخلها مــادة هلامية عكرة تحتوى على مــواد غذائية فى صورة حبيبات. وقبل انتثار حبوب اللقاح من المتك تنقسم نواة حبة اللقاح إلى نواتين تتميز إحداهما بكثافة السيتوبلازم المحيط بها، وتسمى نواة جنسية Generative nucleus أو خلية

تناسلية وتبقى صغيرة بدون جدار، بينما النواة الأخرى كبيرة وتسمى نواة خضرية Vegetative nucleus.

الأعضاء المؤنثة فى النبات

يمثل المتاع Gynaecium عضو التأنيث بالزهرة فى نباتات مغطاة البذور Angio-sperms. ويتكون المتاع من كربلة واحدة أو عدة كرابل. وتتركب الكربلة Carpel من جزء قاعدى يعرف بالمبيض Ovary ويعلو المبيض خيط رفيع يعرف بالقلم Style. ويوجد فى الطرف العلوى للقلم جزء منتفخ يسمى بالميسم Stigma. والميسم جسم كروى صغير وبرى أو أملس مغطى بطبقة لزجة لاقتناص حبوب اللقاح. ويحتوى المبيض على بويضة Ovule واحدة أو أكثر. وتقوم البويضة بوظيفة الخلية التناسلية الأمية، فيها ينشأ الجنين بعد الإخصاب أو هى الكيس الذى يحتضن الجنين بداخله. ولذلك تسمى البويضة علميا بالخلية الأمية للكيس الجنينى Embryo- sac mother cell مثلها مثل الخلية الأمية لحبوب اللقاح. وتتركب البويضة أساسا من نسيج النيوسيلة Nucellus محاطا غالبا بغطاء من الخارج متكون من غلاف أو غلافين ماعدا منطقة خاصة يتكون فيها النقير Micropyle وقد يكون نسيج النيوسيلة بدون أغلفة. وحيث إن البويضة وظيفتها تناسلية فلابد وأن تدخل فى انقسام اختزالى (ميوزى) لتكوين خليتين Dyad، ثم انقسام عادى (ميتوزى) للوصول إلى دور أربع الخلايا Tetrad، وهى النتيجة النهائية للانقسام الاختزالى. وتحتوى كل من الخلايا الأربع على نصف العدد الأصلى من الكروموسومات. ثم تهضم ثلاث من الخلايا الأربع وتبقى خلية واحدة فقط فى المبيض وتعتبر نواة أنثوية حقيقية تبدأ فى تكوين الكيس الجنينى. وتنقسم النواة الأنثوية الحقيقية إلى ثلاث انقسامات بطريقة الانقسام العادى Mitosis ليتكون بعدها ثمانى أنوية جميعها مختزلة، أى تحتوى على نصف عدد كروموسومات الخلية الجسمية. ويحدث بعدها توزيع للثمانى أنوية فى فراغ الكيس الجنينى، فتتجه ثلاث منها نحو أحد أقطاب الكيس الجنينى وتسمى بخلايا Antipodal. وتتجه ثلاث أخرى نحو القطب الآخر حيث تمثل خلية منهم الخلية الأنثوية الحقيقية True female egg

وتسمى الخليتان بالخلايا المنشطة Synergetic cells. وتبقى نواتان من ثمانى الأنوية، وهاتان تندمجان معا لتكونا نواة ثنائية العدد الكروموسومى وتسمى بالنواة المندمجة Fusion nucleus أو النواة القطبية Polar nucleus وبعد انتهاء هذا التوزيع يصبح الكيس الجنينى مؤهلا لاستقبال حبوب اللقاح. وزراعة البيضة معمليا قبل إخصابها يؤدى إلى إنتاج نبات أحادى العدد الكروموسومى. وبمضاعفة عدد الكروموسومات فيها تنتج نباتات مماثلة لنبات الأم. وزراعة المبيض أو البويضة أو الكيس الجنينى بجميع محتوياتهم سيؤدى إلى إنتاج نباتات مختلفة فى عدد الكروموسومات، إذ يؤدى إلى إنتاج نباتات ثنائية من الخلايا الثنائية ونباتات أحادية من الخلايا الأحادية.

التلقيح والإخصاب

تنتقل حبة اللقاح إلى الميسم، وتسمى بعملية التلقيح Pollination. ثم تنبت حبة اللقاح مكونة أنبوبة لقاحية Germ tube تخترق نسيج الميسم ثم القلم متجهة نحو المبيض ثم الكيس الجنينى ثم البويضة. وعند بدء إنبات حبة اللقاح على الميسم أو قبل ذلك مباشرة تنقسم الخلية الجنسية (الذكرية) إلى خليتين Dyad. وعند وصول طرف أنبوبة اللقاح إلى البويضة تختفى عادة النواة الخضرية Vegetative nucleus. ثم تفرغ أنبوبة اللقاح محتوياتها فى الكيس الجنينى فتندمج إحدى الأنوية الذكرية مع البيضة (النواة المؤنثة الحقيقية)، ويسمى ذلك بالاندماج أو الإخصاب Fertilization، وتنتج نواة الزيجوت Zygote التى تحتوى على عدد من الكروموسومات يساوى الموجود فى الخلية الجسمية. أما النواة الذكرية الثانية فتندمج مع النواة المندمجة القطبية Polar nucleus وينتج عن هذا الاتحاد نواة واحدة هى نواة الإندوسبرم Endosperm تحتوى على ثلاثة أضعاف العدد الأساسى من الكروموسومات، لأنها تنشأ من اتحاد ثلاث أنوية تحتوى كل منها على نصف العدد الأساسى من كروموسومات الخلية الجسمية. وبانتهاء الإخصاب وتكوين الجنين (الزيجوت) واكتمال نمو الجنين يكون قد اكتمل تكوين البذرة.

تعريف النباتات الأحادية Haploid plants

يعرف النبات الناتج من الطور الجرثومى Sporophyte (حبة لقاح أو بيضة) بأنه نبات أحادى Haploid عقيم تحتوى خلاياه على نصف العدد الكروموسومى الموجود فى الخلية الجسمية. والنبات الأحادى قد يكون مصدره حبة لقاح ويسمى نشوءا ذكريا Androgene-sis، أو مصدره بيضة غير مخصبة ويسمى نشوءا أنثويا Genogenesis أو نشوءا بكريا Par-thenogenesis; Apomixes. وتضاعف عدد الكروموســومات فى النباتات الأحادية يؤدى إلى إنتــاج نباتــات متضاعفة Polyhaploids أى إنها نباتــات متضاعفة ومصدرها نباتات أحاديــة. وهى نباتــات خصبة منتجة للبذور. وبدأت تجــارب زراعة المتوك عام ١٩٧٠ على الأرز والقمح فى الصين، ثم امتدت التجارب إلى الذرة والشــوفان والتريتيكال والتبغ والقطن وفول الصويا والشــلجم والكرنب الصينى والفلفل وبعض الأشــجار والشــجيرات وكثــير من نباتات الزينة. وشملت زراعة المتــوك وحبوب اللقاح الآن أكثر من ١٧١ نوعا نباتيا ينتمون إلى ٦٠ جنسا و٢٦ عائلة نباتية. ومازالت تحتاج إلى مزيد من البحث لحل بعض الصعوبات التى تواجه إنتاج النباتات الأحادية لبعض المحاصيل.

أهمية النباتات الأحادية

١- إنتاج سلالات نقية

يمكن الحصول على سلالات نقية بطرق تقليدية تشمل التهجين والتلقيح الذاتى أو الرجعــى لعدة أجيال مع الانتخاب للتخلص من الصفات غير المرغوبة. ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى مجهود وفترة زمنية طويلة. بينما زراعة المتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة فى المعدل يمكن إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Haploid، فإذا عوملت النبتات المعملية الأحادية بالكولشســين يتضاعف عدد الكروموســومات فيها وتنتج ســلالات ثنائية Dihaploid خصبة متجانسة Homozygous وثابتة وراثيا Isogenic فــى وقــت قصير. وقد أنتجت ســلالة ذرة "Qun-Hua" بزراعة المتوك فى فترة تقل عشــر سنوات بالمقارنة بإنتاج سلالة مماثلة فى التجانس بالطرق التقليدية.

وتميــزت هذه الســلالة بارتفاع المحصول وقدرة عالية علــى التوافق الهجينى حيث أدخلــت فى إنتاج ٦٢ هجينا، تميز منها ٥٦ هجينــا بارتفاع المحصول، وقد تفوق الهجين Qun (411 x Hua) عليهم جميعا (Wu, et al, 1980).

٢- استحداث تنوع وراثى فى النباتات الأحادية المتضاعفة

نباتات الأرز الناتجــة من الجيل الأول «F1» للهجين «Jili x Xian nong 5675» هى نباتات ثنائية غير متجانســة لأنها تحتوى على جينات متجمعة من الصنفين. وبالزراعــة المعملية لحبوب لقاح الجيل الأول (F1) نتجت نباتات فى الجيل الأول (H1) مختلفــة فى تركيبها الوراثى. وبمضاعفة العدد الكروموســومى لهذه النباتات ظهــرت ٧ تكوينــات وراثية، بعضها يحمل صفات الصنــف الأول وبعضها يحمل صفــات الصنف الثانى، والبعض الآخر جمع بين صفات الصنفين (Institute of genetics 1974, 1977b) (شكل ١).

شكل (١) مقارنة بين برنامج تربية نباتات أحادية وبرنامج تربية تقليدية

برنامج تربية للنباتات الأحادية	برنامج تربية تقليدية
نبات الأم ↓ زراعة حبوب لقاح أو متوك أو بيضة ↓ → إنتاج نباتات أحادية ← ↓ ↓ تضاعف ذاتي تضاعف بالكولشــين ↓ ↓ ← ← H1 → → نباتات ثنائية متجانسة ↓ H2	نبات الأم X نبات الأب ↓ F1 ↓ F2 - 5 التلقيح الذاتىأو التهجين الرجعى مع الانتخاب ↓ ↓ F6 سلالات ثابتة وراثيا

٣- استحداث أصناف جديدة من الأرز والقمح والتبغ

بزراعة متوك الجيل الأول الهجين (F1) من الأرز والقمح والتبغ تم الحصول على:

(أ) صنفين من الأرز هما (Hua Yu No.-1) و(Hua Yu No.-2) يتميزان بمحصول مرتفع من الحبــوب (٧٥٠٠ كيلوجرام/ هكتار) ومقاومة اللفحة البكتيرية Bacterial blight والتأقلـم للبيئة بدرجة عالية. وصنفــين آخرين هما (Xin Xiu) و(Tang Huo No.-2) يتميزان بارتفاع المحصول (Chen and Li, 1978).

(ب) ســلالة جديدة من القمح الشــتوى تســمى (Jingdan-2288) تتميز بسنابل كبــيرة وارتفــاع محصول الحبوب وقوة نمو الأشــطاء ومقاومة مــرض الصدأ المخطط Stripe rust والبياض الدقيقى Powdery mildew وقصر الســاق ومقاومة الرقاد (Institute of genetics, China, 1977b).

(جـــ) الصنف (Danyu No.-1) من التبغ متفوق بجــدارة على آبائه فى المحصول ومقاومة الأمراض. واســتغرق ٣ ســنوات من زراعة حبوب لقاح الجيل الأول الهجين حتى تم توزيعه على المزارعين (Institute of Tobacco, Shantung, China, 1974a).

٤- رفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية

تحتوى النباتات الأحادية على طاقم واحد من الكروموسومات، لذلك فإنها ثابتة وراثيا أى إن صفاتها الســائدة تظل سائدة والمتنحية تظل متنحية، والتعبير الوراثى للصفات الوراثية شــديد التباين. فمثلا تهجين الصنــف Sonora- 62 من القمح ذات الحبــوب الحمراء مع الصنف Hongtu ذات الحبــوب البيضاء كانت حبوب الجيل الأول (F_1) الناتجــة حمراء اللون، لأن اللون الأحمر ســائد على اللون الأبيض. وفى الجيل (F_2) تم الحصول على ٤١٣ نبات منهم ٣١٣ نبات حبوبه حمراء و١٠٠ نبات حبوبه بيضاء، وكانت نســبة الانعزال (٣,١ : ١). وأوضحت هذه التجربة أن تربية النباتات الأحادية من الممكن أن ترفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية مع ســهولة التخلص من الكايميرا (Institute of genetics 1974 , 1977b).

٥- إنتاج نباتات مذكرة

يمكــن الحصول على نباتات مذكرة من الذرة والأســبرجس Asparagus. وتتميز نباتات الأسبرجس المذكرة على النباتات المؤنثة فى إنتاج محصول المهاميز (الطرف القمى من الساق وهو الجزء الصالح للغذاء)، كما أن النباتات المذكرة تعمر أطول من النباتات المؤنثة (Wu, et al, 1980).

٦- سهولة استحداث الطفرات فى المزارع الأحادية

يعتمــد نجاح تحســين أى محصول على مقــدار التغييرات الوراثيــة المتوفرة مع انتخاب الأفضل من هذه التغييرات. ويعتبر الإشــعاع والمطفرات الكيميائية وســائل ناجحــة فى إحداث تباينات وراثية. وتعتبر مزارع الكالس الغنية بالســيتوكاينينات مصــدرا هاما أيضا للحصول على تباينات وراثية. وتيســر زراعــة الخلايا الأحادية دراســة وراثة الخلايا الجســمية، لأنه فى بعض الحالات قد تكون للطفرة الخلوية Mutant cell lines أهمية خاصة. والطفرات الناتجة من معظم الخلايا الأحادية ليس لها تعبير جينى لأنها طفرات متنحية. ويمكن استخدام خلايا الكالس أحادية العدد الكروموسومى فى دراسة تأثير بعض المطفرات مثل الإشعاع والكيماويات، وقد تميزت فــى ذلك الخلية الأحادية وحبوب اللقاح على المتوك، حيث تؤدى زراعة المتوك إلى إنتاج نباتات أحادية Haploids بجانب نباتات مختلفة التضاعف. وتســتخدم مزارع الخلايا الأحادية ومزارع البروتوبلاســت بنجاح فــى عزل خلايا طافرة Mutant cell lines لأنــواع نباتيــة عديدة مقاومة للمضاد الحيوى ستربتومايســين وطفرات مقاومة لمركب 5-Bromodeoxy- uridine (Maliga, et al., 1973) وطفرات مقاومة لمركب Me-thionine sulfoximine وطفرات مقاومة لنيماتودا البطاطس وطفرات مقاومة لدرجات حرارة مختلفة (Wenzel and Uhrig, 1981). كذلك تم الحصول على طفرات بتعريض نبتات تبغ حديثة العمر، ناتجة من زراعة المتوك، إلى جرعات من ١,٥ إلى ٣ كيلوراد من أشعة جاما. وأظهرت هذه الطفرات نسبة عالية من التغييرات الوراثية فى الشكل

والحجم ولون الزهرة وبعضها كانت كايميرا مؤكدة. ونتجت طفرة أزهارها بيضاء بعد زراعـــة متوك نبـــات التبغ على بيئة مضاف إليها ١٠^-٦ مولـــر من مادة (Nitsch and Nitsch N-3-Nitrophenyl-N-Phenylurea (Nitsch, 1969. وقـــام Devreux and Sac- cardo (1971) بتعريـــض براعم زهرية للصنف Virginia Bright من التبغ *Nicotiana tabacum* إلى الجرعة واحد كيلوراد من أشـــعة X-. ثم زرعت المتوك بعد فصلها من الأزهار المشـــععة على بيئة غذائية وكانت النتيجة أن ظهرت تشوهات كروموسومية بنســـبة ٦٪. كذلك بتطبيق زراعة المتوك أمكن استحداث تغييرات وراثية فى العديد من النباتات وانتخبت ســـلالات منها وأصبحت بعد ذلك أصنافا تجارية. فمثلا فى الصين اســـتحدثت أصنافا جديدة من الأرز تســـمى Tanfong-1 (Yin, et al., 1976) و Huagu-2 وHuagu-1 ومـــن القمح تســـمى Lunghua-1 وHuapei-1 ومن التبغ تســـمى Tanyu-1 (Hu, et al., 1978) وTanyu-2 وTanyu-3. وفى اليابان اســـتحدث صنف F-211 من التبغ مقاوم للذبول البكتيرى من خلال زراعة المتوك.

إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح

أهمية زراعة حبوب اللقاح

١- يفضل زراعة حبوب اللقاح لتجنب الصعوبات الناتجة عن صلابة جدر متوك بعض الأنواع النباتية.

٢- النباتات الناتجة من حبوب اللقاح متجانســـة بعد تضاعف كروموســـوماتها بالكولشسين، ولاينتج عنها انعزالات وراثية، وأن حوالى ٩٠٪ من السلالات الناتجة هـــى ســـلالات ثنائية لها تعبير جينى متجانس. بينمـــا النباتات الناتجة من زراعة المتـــوك تحتوى على نباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح ونباتات ثنائية مصدرها جدر المتك والأنسجة الضامة به.

٣- تعطى حبوب اللقاح جنينا ذكريا مباشرة. وهذا يسهل الدراسة وتتبع التغيرات الوراثية والفســـيولوجية والبيوكيميائية للأجنة الذكرية الناشـــئة مثل متابعة مراحل

تكويـن الأجنة من حبوب اللقـاح ابتداء من تكوين الخليــة الفردية Uninucleus، ودراســة الامتصاص Uptake والتحور الوراثى Transformation وتأثير المطفرات مثل المطفرات الكيميائية والفيزيقية مثل أشعة جاما وأشعة –X.

خطوات زراعة حبوب اللقاح Pollen grains culture

فصل حبوب اللقاح

١– بالنســبة للأزهار الكبيرة مثل أزهار الداتورا *Datura innoxia* والبيتونيا *Petunia hybrida*، تفصــل حبــوب اللقاح من متوك طازجــة. وتتم هذه الخطوة داخل كابينة معقمة.

٢– بالنســبة للأزهار الصغيرة، تعقم البراعم الزهرية أو النورات تعقيما سطحيا. وتفصل المتوك وتوضع فى الدورق الزجاجى الخاص بجهاز المجنس Homogenizer يحتوى على بيئة سائلة ، ويفضل استخدام دوارق زجاجية نوع Potter-Elvehjem، وبذلـك يمكن الحصــول على حبوب لقاح معلقة فى بيئة ســائلة ومعها بقايا جدر المتك. ومن الضرورى بالنســبة لنبات التبــغ *Nicotiana tabacum* زراعة المتوك فى بيئة سائلة لمدة ٤– ٦ أيام قبل فصل حبوب اللقاح. ويرشح المحلول لفصل حبوب اللقاح عن بقايا جدر المتك، ويســتخدم لذلك قماش نايلون مســاميته دقيقة تســمح بمرور البيئة السائلة ومعها حبوب اللقاح فقط.

٣– توضــع حبــوب اللقاح المعلقة فى بيئة ســائلة فى جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة (g. x 10) لمدة أربع دقائق. ثم يتم التخلص من معظم البيئة السائلة إلا القليل منها المحتوى على حبوب لقاح متجمعة. ثم يضاف إليها بيئة سائلة طازجة لغسل حبــوب اللقــاح. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات مع الحرص على إضافة بيئة جديدة طازجة كل مرة لضمان حسن غسل حبوب اللقاح.

٤ – تنقل حبوب اللقاح مع كمية بســيطة من البيئة الســائلة إلى دوارق الزراعة المعملية المحتوية على بيئة ســائلة طازجة، وقد تســتخدم بيئــة صلبة طازجة بدلا

من البيئة السائلة. ويفضل فى حالة الزراعة فى بيئة سائلة استمرار تحريك دوارق الزراعة بصورة بطيئة لضمان انتشار حبوب اللقاح فيها، وإن كانت عملية تحريك دوارق الزراعة ليست ضرورية مع بعض النباتات مثل Datura والتبغ Nicotiana.

تحفيز حبوب اللقاح

١- ثبت أن غياب منظمات النمو من البيئة يؤدى إلى تحفيز حبوب اللقاح لتكوين أجنة، بينما إضافتها للبيئة يؤدى إلى تكوين قليل من الكالس بجانب الجنين.

٢- لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* تستخدم بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية المذكورة فى بيئة Bourgin and Nitsch, 1967 (H) مضافا إليها الحديد لتحفيز حبوب اللقاح على النمو. ثم تنقل حبوب اللقاح بعد ذلك إلى بيئة طازجة مضافا إليها ٨٠٠ ملليجرام/ لتر جلوتامين Glutamine + ١٠٠ ملليجرام/ لتر سيرين Serine + ٥٠٠٠ ملليجرام/ لتر إينوسيتول Myo-Inositol + أملاح العناصر المعدنية بقدر يعادل أربعة أمثال تركيزها الأساسى فى البيئة الغذائية (H) (جدول ١).

٣- يمكن دفع حبوب لقاح الداتورا *Datura innoxia* للنمو بزراعتها فى بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية + ٢٪ سكروز ثم تحضن عند ٢٥- ٣٠°م، ويبدأ انقسام الخلايا بعد ٢٤ ساعة من الزراعة. وبعد ٧٢- ٩٦ ساعة يزداد انقسام الخلايا ويبدأ تخصصها وتكوين أجنة ثم تنمو الأجنة إلى نباتات.

٤- يزداد نشاط تكوين الأجنة من حبوب اللقاح أو المتوك كثيرا برفع تركيز السكروز وMyo-Inositol فى البيئة، حيث إن زيادة تركيز السكروز من ٠,٠٨٨ إلى ٠,١٨ مولر من العوامل الهامة لخروج النبتات من حبوب اللقاح والمتوك وله تأثير جيد على النمو وينظم الضغط الأسموزى للبيئة.

٥- التركيزات المرتفعة من أيونات الأمونيوم Amonium توقف تكوين الكالس الناتج من حبوب لقاح الشعير والأرز. وتحتوى بيئة (N6) على نسبة منخفضة من الأمونيوم وزيادة أيونات النيترات Nitrate. لذلك تعتبر بيئة (N6) هى أكثر البيئات

كفاءة بالمقارنة ببعض البيئات الأخرى المستخدمة فى زراعة متوك الأرز والنجيليات الأخرى (Chu, et al., 1975) (جدولى ٢ و٣).

٦- يضـــاف أحيانا مســتخلص درنات البطاطس إلى بيئـــة «Mille's medium» لزراعـــة متوك التبغ. واســتحدثت بيئـــة «Potato II medium» تحتوى على ١٠٪ مســتخلص بطاطس + ٥٠٪ من قوة العناصر الكبرى للبيئة «WH» + أملاح حديد + ثايمين Thiamine بالتركيز المذكور فى بيئة (MS). وزيادة نسبة الثايمين فى هذه البيئة يشجع إنتاج الكالس (Institute of Genetics, 1977b) (جدول ٤).

جدول (١) المكونات الأساسية لبيئات غذائية خاصة بزراعة المتوك وحبوب اللقاح (ملليجرام/لتر)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
KNO3	2830	1000	950	950	2500
$NH_2 NO_3$	-	100	825	720	-
$(NH_4)_2SO_4$	463	-	-	-	134
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	-	347	-	-	-
$CaCl_2 . 2H_2O$	166	-	220	166	750
KCl	-	65	-	-	-
$MgSO_4 . 7H_2O$	185	35	185	185	250
KH_2PO_4	400	300	85	63	-
$NaHPO_4 . H_2O$	-	-	-	-	150
$MnSO_4 . 4H_2O$	4.4	4.4	11.2	25	10
H_2PO_4	1.6	1.6	3.1	10	3

تابع جدول (١)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
$ZnSO_4.7H_2O$	1.5	1.5	4.3	10	2
KI	0.8	0.8	0.4	-	0.75
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	-	0.13	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	-	-	0.013	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	-	-	0.013	-	0.025
$FeSO_4.H_2O$	27.8	-	14	-	-
Na_2EDTA	37.5	-	19	37.5	-
NaFeEDTA	-	32	-	-	-
Sequestrene	-	-	-	Fe 330	40
Thiamine- HCL	1.0	0.1	0.05	0.5	10
Pyridoxin- HCL	0.5	0.1	0.25	0.5	1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.25	5.0	1
Folic acid	-	-	-	0.5	-
Biotin	-	-	-	0.05	-
Glycine	2	2	1	2	-
Glutamine	-	-	-	-	800
m- Inositol	-	-	50	100	100
Sucrose x 10^3	50	30	30	20	100
pH	5.8	6	5.5	5.5	5.8

جدول (٢) محتوى بيئة (N6) من العناصر والحديد والسكروز والأحماض الأمينية لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات (Chu, 1978)

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
$(NH_4)2SO_4$	3.5 mM	FeSO4.7H2O	5 mM (Solution)
KNO_3	0.03 M	Glycine	0.027 mM
KH_2PO_4	3.0 mM	HCl-Thiamine	3.0 µM
$MgSO_4.7H_2O$	0.75 mM	HCl-Pyridoxine	2.4 µM
$CaCl_2.2H_2O$	1.13 mM	Nicotinic acid	4.1 µM
$MnSO_4.4H_2O$	0.02 mM	Sucrose	0.15 M
$ZnSO_4.H_2O$	5.2 µM	Agar	0.1 – 1.0%
H_3BO_3	0.025 mM	PH	5.6
KI	4.8 µM		

□□□

جدول (٣) محتوى بيئة (N6) من الأكسينات والسيتوكاينينات لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات

الهدف من الزراعة	مرحلة نمو حبوب اللقاح	السكروز (M)	إضافات هامة (M)	إضافات مفيدة (µM)
Callus induction: -Oryza sativa	-Middle or late uninuclear	0.15	9.0 2,4-D	5.4-11.0 NAA, 300-500 mg/l*
-Triticum, triticale, Secale	-Middle uni-nuclear	0.23-0.29	9.0 2,4-D	*1.4-2.3 KIN, 500 mg/l LH, 0.55 mM myo-inositol, 0.4mg/l Vit. B,
-Zea mays	-Middle uni-nuclear	0.35-0.44	9.0 2,4-D	* 2.3 KIN, 500 mg/l CH or LH, 0.5% active carbon
Shoot from callus: -Oryza sativa	-Middle or late uninuclear	0.15	0	*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN,
-Triticum, triticale, Secale	-Middle uni-nuclear	0.23	0	*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN
-Zea mays	-Middle uni-nuclear	0.23	0	*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN

تابع جدول (٣)

إضافات مفيدة (µM)	إضافات هامة (M)	السكروز (M)	مرحلة نمو حبوب اللقاح	الهدف من الزراعة
				Pollen embryo and plantlet
--	0	0.088	-Middle or late uninuclear	-Oryza sativa
--	0	0.23	-Middle uni-nuclear	-Triticum, triticale, Secale
--	0	0.35	-Middle uni-Nuclear	-Zea mays

c.f. Chu, 1978 * LH = Lactalbumin hydrolysate

جدول (٤) مكونات بيئة البطاطس Potato II medium لزراعة متوك القمح

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
$(NH_4)2SO_4$	0.75 mM	FeSO4.7H2O	0.1 mM (Solution)
KNO_3	9.9 m M	Aqueous potato medium	10%
KH_2PO_4			
$MgSO_4.7H_2O$	1.5 mM	Glycine	-
$CaCl_2.2H_2O$	0.51 mM	Na2EDTA . 2H2O	0.11 mM
$MnSO_4.4H_2O$	-	Thiamine-HCl	3.0 µM
$ZnSO_4.H_2O$	-	Pyridoxine-HCl	-
H_3BO_3	-	Nicotinic acid	-
KI	-	Sucrose	0.26 M
KCl	-	Agar	0.1 – 1.0%
	0.5 mM	PH	5.8

c.f. Chu, et al., 1975

طرق زراعة حبوب اللقاح

تزرع حبوب اللقاح مباشـرة فى أطباق بترى مثـل زراعة الخلايا الفردية ويمكن زراعتها معلقة فى بيئة سـائلة. وتستخدم إحدى الطرق الآتية لزراعة حبوب اللقاح وتكوين أجنة ذكرية Androgenesis.

١- طريقة الزراعة الحاضنة Nurse culture technique

تسـتخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح نبـات الطماطم *Lycopersicon esculentum*. حيث توضع المتوك على سـطح البيئة الغذائية الأساسـية الصلبة فى أطباق بترى ثم تغطى بقرص صغير من ورق الترشـيح. ثم تضاف قطرات من البيئة الغذائية المعلق بها حبوب اللقاح على أقراص ورق الترشـيح بمعدل ١٠ حبوب لكل قرص. ثم تحضن البيئة ومحتوياتها عند ٢٥°م مع وجود ضوء مستمر. وبعد ٢٨ يوما تقريبا تظهر عناقيد من خلايا خضراء بنسـبة ٦٠٪ من حبوب اللقاح المنزرعة، وهى مسـتعمرات خلوية أحادية العدد الكروموسومى. وثبت من هذه التجربة أنه لا يمكن إنتاج الخلايا الخضراء فى حالة زراعة حبوب اللقاح بدون وجود المتوك فى البيئة الغذائية. وبالرغم مـن نجاح هذه الطريقة فى زراعـة حبوب لقاح نباتات الطماطـم، إلا إن تطبيقاتها العملية ما زالت قاصرة على بعض الأنواع النباتية (Sharp, et al., 1972).

٢- طريقة القطرة المعلقة Hanging drop

تسـتخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقـاح الكرنب *Brassica oleracea* وحبوب لقـاح الهجـين "B. oleracea. x *B. alboglabra*" (Kameya and Hinata1970) ومضمونها:

- توضـع قطرة من البيئـة الغذائية مضاف إليها ماء جوز الهند، تحتوى القطرة على ٥٠- ٨٠ حبة لقاح، على غطاء شريحة زجاجية Cover ثم يوضع هذا الغطاء مقلوبا على شريحة زجاجية مقعرة.

- يفضل تثبيت عمود صغير من شمع البرافين وسط الشريحة المقعرة، ثم يثبت غطاء الشريحة الحامل للقطرة المعلقة مقلوبا على الشريحة المقعرة، ثم تثبت الشريحة المقعرة مع غطاء الشريحة بشمع البرافين وترج الشريخة بحركة دائرية لتحسين التهوية. وبعد أربعة أسابيع تتكون عناقيد من الخلايا المنبثقة من حبوب اللقاح.

٣- طريقة نيتش Nitsch, 1974; 1977 method

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* وتشمل الخطوات التالية:

- تفصل المتوك وتزرع فى بيئة سائلة تحت ظروف معقمة. ثم تحضن لمدة أربعة أيام عند ٢٧°م، بعدها تستخلص حبوب اللقاح من المتوك بواسطة جهاز المجنس Homogenizer، وتنقل إلى بيئة سائلة تحتوى على KNO3 (٨,٩ ملليمول) + NH4NO3 (٨,٩ ملليمول) + MgSO4,7H2O (٠,٧٥ ملليمول) + CaCL2 (١,٤٢ ملليمول) + KH2PO4 (٠,٥ ملليمول) + FeEDTA (١٠٠ ملليمول) + Glutamine (٥,٥ ملليمول) + Serine (٠,٩٥ ملليمول) + Myoinositol (٠,٠٣ مول) + Ze-atin (٠,٠٤٦ ميكرومول) + Indole Acetic Acid (IAA) (٠,٥٧ ميكرومول) + Sucrose (٠,٠٦ - ٠,٢٣ مول).

- يرشح معلق الخلايا لفصل البيئة السائلة المحتوية على حبوب اللقاح والتخلص من بقايا جدر المتك، ثم يعامل الراشح المحتوى على حبوب اللقاح بالطرد المركزى لتكوين تجمعات عنقودية من حبوب اللقاح. ثم تفصل حبوب اللقاح وتغسل مرتين ببيئة سائلة باستخدام جهاز الطرد المركزى.

- تنقل حبوب اللقاح إلى بيئة سائلة طازجة لتكوين معلق خلايا كثافته حوالى ٥٠٠٠ حبة لقاح/ ملليلتر.

- توزع أحجام متساوية (٢ ملليلتر) من معلق الخلايا فى طبقات رقيقة فى أطباق بترى صغيرة أو دوارق سعة ٢٥ ملليلتر. وتستخدم طريقة Bajaj, ,1978a التالية إذا كان حجم معلق حبوب اللقاح صغيرا جدا.

٤- طريقة باجاج Bajaj (1978a) method

- توضع قطرة من السليكون فى وسط طبق بترى معقم من البلاستيك قطره ٥سنتيمتر. ثم يوضع غطاء شريحة مقاس ٢٢ X ٢٢ ملليمتر بحذر فوق قطرة السليكون.
- توضع قطرة ٢٥٠– ٥٠٠ ميكرولتر من معلق حبوب اللقاح فوق غطاء الشريحة باستخدام ماصة ميكرومترية. وتغطى الأطباق بواسطة غشاء Parafilm - M، ثم تحضن لمدة ٤– ٦ أيام تحت ضوء ضعيف (٥٠٠ لكس).
- تحضن الأطباق عند ١٤ ساعة ضوئية يوميا وشدة ضوئية ٢٠٠٠ لكس وحرارة ٢٨°م وتبقى حتى النهاية.

عوامل إنجاح زراعة حبوب اللقاح

١– غسل حبوب لقاح نباتات التبغ والداتورا جيدا بعد فصلها من المتوك خطوة هامة للتخلص من المواد المانعة لإنباتها، وتعريضها للبرودة قد يؤدى إلى انقسام ميتوزى Mitosis طبيعى وتكوين أنوية خضرية وتناسلية طبيعية وزيادة حيويتها، وقد تسبب تشوهات فى الانقسام الميتوزى الأول وتثبيط مراحل تطور الجاميطات واختلاف فى إنتاج الأجنة الذكرية. ولذلك يوصى بعدم تعريض حبوب اللقاح للبرودة (Bajaj, 1978).

٢– تتكون الأجنة الذكرية من حبوب اللقاح المفصولة من نبات التبغ عند أية مرحلة من مراحل نمو حبوب اللقاح ابتداء من مرحلة وحيدة النواة Uninucleus والانقسام الميتوزى الأول First mitosis حتى الطور الأخير من تكوين النواتين Late binucleus. وتنخفض نسبة النجاح بدرجة كبيرة كلما تقدمت حبوب اللقاح فى العمر. وزراعة حبوب اللقاح وهى فى مرحلة متوسطة أو متأخرة من النمو وعندها تحتوى على نوية واحدة Mid- or late- Uninucleus– microspores تؤدى إلى الحصول على أفضل عائد من النباتات الأحادية. وحيث إن المتك الواحد يحتوى على جميع أطوار النمو المختلفة لحبوب اللقاح، ابتداء من مرحلة الخلايا الأمية

المنشـئة لحبوب اللقاح حتى مرحلة حبوب اللقاح كاملة النضج، فإن ذلك يؤكد إلى وجود تباين شديد فى النباتات الناتجة من زراعة المتك. وقد تأكد ذلك بزراعة متوك القمح ومحاصيل أخرى (He and Ouyang, 1980) (جدول ٥) .

جدول (٥) طور نمو حبوب اللقاح المناسب للزراعة المعملية

Species	Pollen grain stage	References
- *Hordeum vulgare*	-Uninucleate or late uninucleate	-Clapham, 1971, Zhou & Yang, 1980
- *Oryza sativa spp.*	-Mid or late uninucleate	-Guha et al., 1970, Wang et al., 1973
	-Uninuclcate or late uniculate	-Ghua-Mukherjee, 1973
- *Secalc cereal*	-Late uninucleate	-Sun, 1978
- *Triticale*	-Uninucleate	-Sun, et al., 1973
- *Triticum aestivum*	-Mid- or late uninucleate	-Ouyang,ct al., 1973, Pan & Gao, 1978
- *T. aestivum x Agropyron glaucum*	-Late uninucleate	-Wang et al., 1973

٢ - زراعـة المتوك Anther culture

نباتات يمكن إكثارها بزراعة المتوك

تتميز طرق الزراعة المعملية للمتوك بأنها بسـيطة نسبيا وسريعة ولها كفاءة عالية فى إنتاج نباتات أحادية.

وأمكن إنتاج نباتات أحادية بزراعة متوك أو نباتات أحادية أو أنسـجة أحادية لنباتات عديدة مثل:

Brassica campestris; Brassica oleracea; Brassica pekinensis; Brassica chinensis;

Lycopersicon spp.; Lycopersicon esculentum; Datura innoxia; Datura spp.;

Luffa echinata; Luffa cylindrica; Capsicum annum; Capsicum frutescens; Citrus limon; Citrus medica; Festuca arundinacea; Festuca pratensis; Nicotiana spp.; Populus spp.; Arachis spp.; Hyoscyamus spp.; Freesia spp.; Glycine max; Asparagus officinalis; Beta vulgaris; Fragraria virginiana; Sorghum vulgare; Saccharum sinensis; Tritical; Triticum aestivum; «T.aestivum x Agropyron glaucum»; Vicia faba; Vitis vinifera; Zea mays. Arabidopsis thaliana; Anemone spp.; Agropyron repens; Atropa belladonna;

Cassia fistula; Coffca arabica; Digitalis purpurea; Gladiolus; Hordeum vulgare ; Lilium spp.; Linum usitatissimum; Lotus corniculatus;

فصل وزراعة متوك نبات التبغ

نبات التبغ من الأمثلة النموذجية لإنتاج نباتات أحادية. وتنتخب المتوك غير الناضجة لضمان احتوائها على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus وهى فى مرحلة ما قبل الانقسام الميتوزى الأول (Zhou and Yang, 1980). ويمكن إجراء الآتى لإنتاج أجنة ذكرية Androgenesis.

١- تعقم البراعم الزهرية فى محلول هيبوكلوريت صوديوم بتركز ١٪ (وزن/حجم)، أو محلول كلوركس تجارى Clorox بتركيز ٥٪ (حجم/ حجم). ثم تغسل البراعم مرتين بماء مقطر معقم مرتين. وإذا فصلت البراعم الزهرية من نباتات نامية داخل صوبة محمية فلا تحتاج إلى تعقيم.

٢- تفصل المتوك بإحداث شق من جانب واحد من البرعم الزهرى. ثم يضغط على الأسدية برفق لفصلها. ثم تفصل المتوك بحذر تام حتى لايحدث أى ضرر لها، وتستبعد المتوك التى حدث لها ضرر أثناء فصلها لأنها تميل عادة إلى تكوين كالس. ثم تجمع فى طبق بترى معقم وتزرع مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- تزرع المتوك بمعدل ٥- ١٠ متوك فى الدورق المخروطى مع مراعاة كثافة الزراعة المناسبة.

الاحتياطات اللازمة لفصل وزراعة المتوك

١- تعتبر البراعم الزهرية المقفولة بعد تعقيمها سطحيا مصدرا جيدا للمتوك. حيث تــزال أوراق الكأس والتويج بحذر، مع الحــرص بعدم وصول مواد التعقيم إلى المتوك لتفادى الضرر الذى قد يحدث. وفى نباتات العائلة النجيلية مثل القمح والشعير تعقم السنبلة وهى مازالت متصلة بحامل السنبلة ثم تفصل السنبلة بعد تعقيمها.

٢- يفصل المتك تحت ميكروســكوب إذا كان البرعم الزهرى صغيرا مثل نباتات Asparagus وBrassica. ويتــم ذلك بإزالة غلاف الزهرة Perianth فقط، والإبقاء على باقى أجزاء البرعم على اتصال مع الأســدية. ولا يؤثر وجود بقايا أجزاء الزهرة فى البيئة الغذائية على طبيعة نمو حبوب اللقاح الموجودة داخل المتوك.

٣- فى حالة الأزهار والمتوك كبيرة الحجم تزال الأســدية Stamens بأكملها مع الخيط الحامل لها، ثم توضع فى وضع أفقى ويفصل المتك من الخيط Filament بدقة وحرص. حيث لاتنتقل المواد الغذائية من البيئة الغذائية إلى المتك خلال الخيط وقد يسبب وجوده منع نمو حبوب اللقاح.

٤- تزرع المتوك بعد فصلها مباشــرة على بيئة مناســبة صلبة أو ســائلة، بحيث يكون هناك اتصال مباشر بينها وبين البيئة الغذائية بما يضمن وصول المواد الغذائية إلى حبوب اللقاح. وزراعة المتوك فى بيئة ســائلة يجعلها تطفو على سطحها، لذلك يستلزم تثبيتها على جسر من ورق الترشيح.

٥- بالنســبة للأزهار الكبيرة يمكن الحصول على كثافة جيدة من حبوب اللقاح بزراعة متك واحد/ ملليلتر بيئة ســائلة، حيث تعطى هذه الكثافة حوالى ٥ x ١٠^٤ حبة لقاح/ ملليلتر بيئة فى نبات *Datura innoxia* و٤ x ١٠^٤ حبة لقاح/ ملليلتر بيئة فى نبات *Nicotiana tabacum*. ويمكن زيادة عدد المتوك/ ملليلتر فى البيئة الســائلة بالنسبة للبراعم الزهرية الصغيرة للحصول على نفس الكثافة تقريبا.

٦- تنبــت حبوب اللقاح بعد ٣ - ٤ أســابيع من زراعــة المتوك منتجة نبيتات أحادية لا تشــابه النباتــات الثنائية المأخوذة منها. وقد ينتــج المتك الواحد أعدادا

كبـيرة من النبتـات، ويفضل فصلها عن بعضها مباشـرة بعد تفتـح المتك. وفصل النبيتات فى هذه المرحلة المبكرة يساعد على فصلها ونقلها بسهولة إلى بيئة طازجة جديدة، بينما يؤدى التأخير فى فصل النبتات إلى تداخل وتشـابك جذورها داخل المتك المتفتح مما يؤدى إلى تكوين كالس وتكوين أعداد أخرى من الأفرع.

٧- تنقـل النباتات ذات المجموع الجذرى الجيـد إلى عبوات تحتوى على بيت موس ورمل. ويجب إزالة آثار الأجار جيدا من الجذور قبل النقل. ثم تنقل النباتات للصوبة لتبقى تحت الرى الرزازى (الضبابى) Mist irrigation لمدة عشرة أيام لإتاحة الفرصة لتكوين مجموع جذرى يقوم بوظيفته جيدا.

البيئة الغذائية المناسبة لزراعة المتوك

تسـتخدم بنجـاح بيئـات White, 1963, Murashge and skoog, 1962 Nitsch Nitschm 1969, وغيرها من البيئات المشتقة منهم فى الزراعة المعملية لمتوك الدخان وقد أدخل عليها بعض التطويرات. ويعتبر الحديد من العناصر الهامة المضافة لبيئة المتوك. وتصنف الأنواع النباتية كالتالى:

١- أنواع نباتية لا تحتاج منظمات نمو

تعتـبر بيئـة Murashige and Skoogc, 1962 (MS) والإضافـات التى أحدثهـا Nitsch, (1967) أساسـية لزراعة متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات. وإضافة الفيتامينات والحديد والسـكروز لهم أهمية فى تحفيز نمو وتكوين النبتات مـن حبوب اللقاح أو الكالس. ولا تحتاج هـذه المجموعة إلى منظمات نمو. وتتميز حبوب اللقـاح فيها أنها ثنائية الخليـة Bicellular. وتضم هذه المجموعة الأنواع النباتية الآتية:

Datura innoxia ; Hyoscyamus nigcr ; Petonia hybrida; Nicotiana tabacum; N. sylvestris ; N. panculata ; N. knightiana.

وإضافة الفحم النباتى النشــط تحت البيئة الصلبة فى وعاء زراعة المتوك يســاعد علــى تكوين كالس جيــد وإنتاج أعداد كبــيرة من النبتات لقدرتــه على امتصاص المركبات المثبطة للنمو والمواد الضارة التىيفرزها جدار التك (Nitsch, 1972, 1974) . والتركيــز الأمثل للســكروز هو ٠,٢٦ مولر فى بيئة متوك القمــح و٠,٣٥ مولر لمتوك الذرة. ويفضل زيادة الســكروز فى بيئة متوك النجيليات بوجه عام من ٢- ٤٪ إلى ٨- ١٢٪، وزيادة السكروز فى بيئة متوك نباتات Barley وRapeseed وTritical من ٠,١٨ إلى ٠,٣٥ مولر. (Chen and Li, 1978) ويبين جداول (٢ و٣) البيئات المناسبة لزراعة حبوب اللقاح ومتوك النجيليات.

٢- أنواع نباتية تحتاج إلى منظمات نمو

تضــاف منظمــات النمــو إلى بيئات متــوك وحبوب لقاح هــذه المجموعة من النباتــات، وتختلف احتياجاتها باختلاف النوع والصنف النباتى. وتحتوى هذه الأنــواع على حبوب لقاح ثنائيــة Bicellular أو ثلاثية Tricellular الخلايا، مثل الأنــواع التابعة للأجناس *Tritical; Triticum; Oryza; Hordeum* . ويتكون الكالس إذا زرعت متوك هذه النباتات. وقد تنتج أجنة تنمو وتكون نباتات مثل *Brassica campestris* و*Asparagus officinalis*. والأوكســينات هى أهم الهرمونات المؤثرة فــى طبيعة نمو المتوك، وحاجتها من الســيتوكاينين ومنظمات النمو الأخرى أقل كثيرا من حاجتها للأوكسينات. ومن الأكسينات مركبات عديدة أهمها:

. 3-Indole Acetic Acid (IAA). 3-Indole Butaric Acid (IBA). Naphthalene Acetic Acid (NAA). 2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T). 2,4-Dichloro-phenoxy
Acetic Acid (2,4-D). 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA).
4-Amino- 3,5,6-Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ومن السيتوكاينينات مركبات عديدة أهمها:

. 6-Benzyl Amino Purine (BAP). 6-Benzyl Adenine (BA).
Isopentenyl Adenine (IPA). 6-y-y-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip).

5-(4-Hydroxy-3-Methyl-trans-2-Butenylamino) Purine (Zeatin).
6-Furfuryl - Amino Purine (Kinetin = KIN).

والأنواع النباتية التى تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثلاثية الخلايا Tricellular تحتاج إلى إضافة سكروز بنسبة ٥- ١٥٪. بينما الأنواع التى تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثنائية الخلايا Bicellular فيضاف السكروز بنسبة ٢- ٥٪. والسكروز له تأثير منظم للضغط الأسموزى فى البيئة الغذائية. والتركيز العالى للسكروز ضرورى جدا لتحفيز متوك نبات *Brassica campestris* للنمو، حيث يضاف بتركيز ١٠٪ للبيئة + ٠,١ ملليجرام/لتر من كل من 2,4-D NAA . ويضاف السكروز بتركيز ١٢٪ إلى بيئة متوك نبات الشعير *Hordeum vulgare*، وبتركيز ٦- ٩٪ إلى بيئة الأجناس *Triticum; Tritical; Oryza* مضاف إليه ٢ ملليجراملتر 2,4-D، وبتركيز ١٢٪ لمتوك الذرة *Zea mays* مضاف إليه ٢ ملليجرام/ لتر من Kinetin و-2,4 D. وتعتبر المكونات الأساسية لبيئة (MS) هى الأفضل للأجناس *Zea* و*Tritical* و *Triticum*. ولبيئة (M) Miller قبول واسع فى زراعة متوك الأرز ومتوك نباتات أخرى دون غيرها من البيئات. وقد حدثت بعض التغييرات على بيئة (M) Miller مثل زيادة تركيز النترات وتخفيض الأمونيوم، وعرفت هذه البيئة بعد تحديثها بالرمز (MM)، وتستخدم خاصة لزراعة متوك نبات *Brassica campestris* ويضاف مستخلص الخميرة وماء جوز الهند ومستخلص البطاطا والأحماض الأمينية -Gluta mine و Asparagine إلى مكونات البيئة (MM) لزيادة معدل نمو الكالس من حبوب اللقاح وتكشفه إلى أجنة. ويتم إنتاج النباتات من الكالس بإضافة تركيزات مختلفة من الهرمونات، وتخفيض السكروز إلى ٢- ٣٪. وبتقدم عمر الكالس تنخفض قدرته بشدة على إنتاج نباتات كاملة. كذلك يمكن تغيير نوع وتركيز أملاح العناصر الغذائية فى البيئة. ويفضل قبل نقل النباتات الصغيرة من البيئة الغذائية إلى التربة أن تسبقه الزراعة فى بيئة سائلة ضعيفة تحتوى على أملاح العناصر الغذائية المذكورة فى بيئة White, 1963 + سكر مختزل بتركيز ٠,٥- ١٪.

تحضين المتوك وحبوب اللقاح

تحصن المتوك وحبوب اللقاح بعد زراعتها عند ٢٤–٢٨٠°م. وارتفاع الحرارة عن ٣٠°م تسبب اختلافا كبيرا فى إنتاج ونمو الكالس وعدد النباتات الناتجة منــه. وكان ذلك مؤكدا بالنســبة لنباتات القمح ولفت الزيــت. وأن النباتات المعمليــة الناتجــة من متوك القمح المفصولة من ســنبلة الفرع الرئيســى كانت أكثــر من ســنابل الأفرع الجانبيــة (Hu, et al, 1982). وتعريــض متوك القمح والأرز ومحاصيــل نجيليــة أخرى لحــرارة منخفضة ١– ٤°م لمدة ٤٨ ســاعة قبــل زراعتها يــؤدى إلى زيادة تكوين الكالس وزيــادة الاختلافات (Institute of Genetics,1977a) (جدول ٦). بينما لايوجد ما يشــير إلى أهمية الضوء فى المرحلــة الأولى من زراعة حبوب اللقــاح ومتوك التبغ. ويفضل تعريض حبوب اللقاح والمتوك لفترة ظلام قصيرة جدا يتبعها ضوء مســتمر لمدة ١٤ ساعة يوميا شــدته ٢٠٠٠ لكس لتشجيع نمو النباتات من المتوك وزيادة عددها. بينما جاء فــى مضمون بعض الأبحاث على نباتــات *Hyoscyamus niger* و *Datura in-noxia* أن ١٦ ســاعة ضوء فلوروسنت شــدته ١٥٠٠ لكس Lux وحرارة ٢٨°م يعقبها ٨ ساعات ظلام وحرارة ٢٠°م أعطت أفضل عدد من النباتات. كما أن زيادة تركيز ثانى أكســيد الكربون والإيثلين داخــل أوانى الزراعة يؤثر تأثيرا ضارا على نمو حبوب اللقاح وتكوين الأجنة. لذلك يضاف للبيئة ايدروكســيد بوتاسيوم لقدرته على امتصاص ثانىأكسيد الكربون ومركب Mercuric perchlo-rate لقدرته على امتصاص الإيثلين وإضافة ٨– ٤٠ ملليجرام/ لتر من 2-Chlo-roethyl–phosphonic acid (مــادة منتجة للإيثلين) للبيئة تؤدى إلى تضاعف اســتجابة متــوك الأرز *Oryza sativa* للنمو. ومضمون ذلــك أن حبوب اللقاح والمتــوك تختلف باختلاف نــوع النبات فى احتياجها مــن الظروف الهوائية والغازية لتحفيز نمو وتكوين الأجنة وتكشفها.

جدول (٦) درجات الحرارة والمدة المناسبة لإنبات متوك بعض النجيليات

Species	(°C)	Duration
Hordeum vulgare	3	48 h.
Oryza sativa	10	48 h. or 4 - 7 days
Secale cereal	6	3- 15 days
Triticale	3- 5	72 hr.
Triticun aestivum	3- 5	48 hr.

منشأ الأجنة الأحادية Haploid embryogenesis

١- أجنة ذكرية المنشأ والتكوين Androgenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ فى المعمل من حبوب لقاح (جاميطات ذكرية) Microspores أو متوك بعد زراعتها فى المعمل. وينتج عنها نباتات أحادية. وتختلف هذه النباتات وراثيا وظاهريا عن نبات الأم الذى فصل منه حبوب اللقاح والمتوك. وتنشأ الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

(أ) منشأ أجنة ذكرية من حبوب اللقاح Pollen embryogenesis

– تكوين مباشر للأجنة الذكرية Direct embryogenesis حيث تنتج أجنة أحادية العدد الكروموسومى مباشرة من حبوب اللقاح بدون الدخول فى مرحلة تكوين الكالس. وبعد ٣– ٤ أسابيع تظهر الأجنة فى صورة نموات أنبوبية تنمو وتتطور إلى نبتات أحادية العدد الكروموسومى.

– منشأ غير مباشر للأجنة Indirect embryogenesis حيث يتكون كالس أحادى العدد الكروموسومى من حبوب اللقاح. ثم يتكشف الكالس إلى أجنة أحادية ينتج عنه نباتات أحادية.

(ب) منشأ أجنة ذكرية من المتوك Anther embryogenesis

حيث ينتج عن زراعة المتوك نباتات مختلفة المستوى فى التضاعف الكروموسومى. فالنباتات الناتجة من حبوب اللقاح تكون أحادية العدد الكروموسومى، والنباتات الناتجة من خلايا جدار المتك والخلايا الضامة تكون ثنائية العدد الكروموسومى لأنها خلايا جسمية. وتختلف الفترة اللازمة لخروج النبتات من المتك باختلاف الأنواع النباتية. فتحتاج متوك الدخان من ٣ إلى ٥ أسابيع، وتحتاج متوك نبات الأتروبا والأرز إلى ٨ أسابيع. والمتوك المحتوية على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus والمزروعة على بيئة (MS) يتحول لونها إلى اللون البنى خلال أسبوعين بدون ظهور أى نمو. وبعد أسبوعين آخرين تظهر نموات أنبوبية هى عبارة عن أجنة مصدرها حبوب اللقاح فى المتك، حيث تتطور بعد ذلك لتصبح نبتات أحادية العدد الكروموسومى Pollen embryogenesis. وقد يظهر عند الطرف القاعدى للمتك خلايا كالس تنمو حتى تغطى كل المتك وقد تنتج نبتات من الكالس ثنائية العدد الكروموسومى لأن مصدرها خلايا جسمية. وبعد ٦ أسابيع تقريبا يمكن نقل النباتات إلى التربة.

٢- أجنة أنثوية المنشأ والتكوين Genogenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ من بيضة غير مخصبة، وينتج عنها نبتات أحادية مختلفة وراثيا ومظهريا عن النبات الأم المفصول منه البيضة. وتنشأ هذه الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

- نشوء الأجنة البكرية Parthenogenesis

قد تتكون نباتات أحادية تلقائيا بنسبة لا تزيد عن ٠٫٠١٪ بدون تدخل الإنسان. وهى من الحالات النادرة التى تحدث فى بعض النباتات دون غيرها. ومصدر إنتاج الأجنة البكرية هو المبيض. فقد ينشط المبيض وينمو مكونا ثمرة تحتوى على بذور بدون اخصاب. وهذه البذور أحادية العدد الكروموسومى، وبزراعة هذه البذور فى

المعمـل تنتج نباتات أحاديــة ضعيفة النمو صغيرة الحجم عقيمــة وغير قادرة على الانقســام الاختزالى وتكوين خلايا تناسـلية، لأنها تحتوى على كروموسومات غير متشابهة ولا تستطيع أن تكون أزواجا كروموسومية Bivalents، وهذه من خصائص المجموعة الكروموســومية الأحادية. وتتكون الأجنة الأحادية ذاتيا فى الطبيعة من خــلال التكوين البكرى، أى بدون إخصاب، نتيجــة لزيادة محتواها من هرمونات النمو وقد يحدث التلقيح وتنبت الأنبوبة اللقاحية من حبة اللقاح ولكنها تكون غير قادرة على اســتكمال نموها والنفاذ إلى المبيض وإتمام الإخصاب. ويكون دور حبوب اللقاح فى هذه الحالة هو تنبيه المبيض فقط لإفراز هرمونات النمو.

- نشوء الأجنة من البيضة

هى أجنة تنشأ من البيضة غير المخصبة (الجاميطة المؤنثة) بعد فصلها وزراعتها فى المعمل. وهى أجنة أحادية العدد الكروموســومى ينتج عنها نباتات أحادية لها نفس مواصفات الأجنة البكرية.

بعض الممارسات الوراثية لإنتاج أجنة أحادية

١- طريقة إقصاء الكروموسومات Chromosomes elimination

تســتخدم هذه الطريقة لإنتاج أجنة شــعير أحادية العدد الكروموســومى Haploid بكفــاءة عالية. وتعتمد هــذه الطريقة على إدخال نوع الشــعير *Hordeum bulbosum* فى تهجين مع النــوع *Hordeum vulgare* لإنتاج هجين *"H. bulbosum x Hordeum vulgare"*. فتنمــو أجنــة الهجين لــدة ١٠- ١٤ يوما من الإخصــاب ثم تموت بعد اختفاء كروموســومات النوع *H. bulbosum*. فإذا فصلت أجنة الهجين مبكرا بعد ١٠ أيــام مــن الإخصاب قبل موتها ثــم زرعت على بيئة (B5) خالية من الأكســين 2,4-D فإنها تســتمر فى النمو وتكون نباتات معظمها أحادية العدد الكروموســومى (n = 7)

Monoploid، تحتوى على كروموسـومات النــوع *Hordeum vulgare* فقط. وبمعاملة النباتات بالكولشســين تنتج نباتات ثنائية متجانســة من النوع *H. vulgare*. وتحتوى الخلية الجسمية للشعير ثنائية العدد الكروموسومى Diploid على ١٤ كروموسوما (2n = 14). والجاميطــة المذكرة والمؤنثة هى خلايــا أحادية Haploid تحتوى على نصف عدد الكروموسومات (n = 7). وباندماج الجاميطتين عن طريق التلقيح والإخصاب ينتج الهجين *«H. bulbosum x «H. vulgare»* الذى تحتوى أجنته على ١٤ كروموسوما، أى أجنة ثنائية العدد الكروموسومى (2n = 14) وخاصية إقصاء Elimination كروموسومات النوع *H. bulbosum* بعد التهجين هى صفة وراثية بصرف النظر عن اســتخدامه كأب أو أم فىالتهجين أو إذا كان ثنائيا Diploid أو رباعيا Tetraploid.

كذلــك تم الحصول علــى نباتات قمح أحادى بتهجين قمح سداســى *Triticum aestivum (2n = 6X = 42)* مع شــعير ثنائــى *H. bulbosum (2n = 2X = 14)*. وقد حــدث إقصاء (تخلص ذاتى) لكروموســومات النــوع *H. bulbosum* وتكونت أجنة أحادية من القمح *T. aestivum* (n = 3X = 21). وقد تميزت هذه الطريقة عن طريقة زراعة المتوك فى إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى من أى صنف تجارى من الشعير. ومعدل إنتاج النباتات الأحادية مرتفع جدا. كذلك يمكن الاستفادة من هذه الطريقة فى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة Dihaploids من نباتات البطاطس *Sola-num tuberosum* الرباعية Tetraploids بواسطة تهجين النوع *Solanum tuberosum* بحبوب لقاح من النوع *S. phureja* الثنائى.

٢- زراعة الإندوسبرم Endosperm culture

تم الحصــول على كالس وأجنة ونبتــات ثلاثية التضاعف الكروموســومى Triploids بزراعة نواة الإندوسبرم المفصولة من الكيس الجنينىللموالح (3n = 27) بعد حوالى شهرين من الإخصاب. وقد تحقق ذلك بزراعة الاندوســبرم المفصول من الموالح *Citrus grandis* L. Osbeck صنــف Bei Pei Pummels والنوع *C. sinensis* Osbeck صنف Chin- Cheng or-ange على بيئة غذائية (2 MT) مضافا إليها (GA3) بتركيز ٥,٧٧ – ٤٣,٣ ميكرومولر.

العوامل المؤثرة فى تكوين الأجنة الذكرية

Androgenesis

تنتــج أجنة ذكرية فى المعمــل بزراعة متوك بعض الأنواع النباتية التابعة للعائلة الباذنجانيــة Solanaceae والنجيلية Gramineae والصليبيــة Cruciferae. والعوامل المؤثرة فى إنتاج الأجنة الذكرية منها:

١- عمر النبات

يؤثر عمر النبات والمرحلة الفسيولوجية تأثيرا واضحا على تكوين الأجنة الذكرية. فالأزهــار المفصولة من نباتات حديثة العمر نســبيا وفى بداية موســم التزهير تكون مناسبة لإنتاج أجنة ذكرية أكثر من البراعم الزهرية المفصولة من نباتات متقدمة فى العمر أو فى نهاية موسم التزهير.

٢- مرحلة نمو حبوب اللقاح

مرحلة نمو حبوب اللقاح من العوامل الهامة المؤثرة فى إنتاج أجنة ذكرية. فزراعة متــوك التبــغ والداتورا والهيوســيامس *Hyoscyamus* وهى فــى مرحلة تكون فيها حبوب اللقاح أحادية النواة Uninucleate تنتج نباتات أحادية العدد الكروموســومى فقط . بينما زراعة حبوب لقاح متقدمة فى العمر تعطى نباتات متعددة فى مســتوى التضاعف الكروموســومى، وكانت أفضل النتائج بالنســبة لنباتات التبغ والطماطم عندما كانت حبوب اللقاح فى مرحلة ثنائىالنواة Binucleate .

٣- الصدمات الحرارية Thermal shocks

الصدمات الحرارية المرتفعة أو المنخفضة أو المتبادلة مع بعضهما تظهر نجاحا فى تكوين الأجنة الأحادية فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح، وقد تحقق ذلك فى نباتات

الداتــورا والطماطم والأتروبا والتبغ. والمعاملة الباردة التى يعقبها فترة قصيرة حرارة مرتفعة تؤدى إلى انقسام متكرر لحبة اللقاح. وتعريض متوك نبات الكرنب *Brassica* لحرارة ۳۰°م لمدة ٢٤ ســاعة أو ٤٠°م لمدة ســاعة واحدة كان له تأثير منشط لتكوين الأجنة الذكرية (Keller, et al. 1981). وقد فســر ذلك بأن المعاملة الباردة لها تأثير غير مباشر فى زيادة عدد الأجنة الذكرية، والحرارة المنخفضة ٣- ٥°م تحافظ على حيوية حبوب اللقاح مدة طويلة وتؤخر شــيخوختها وتمنع اجهاضها. ويزداد بذلك عدد حبوب اللقاح القادرة على تكوين أجنة ذكرية (Bajaj 1978a). بينما الصدمات الحرارية تؤدى إلى تحلل الأنابيب الدقيقة Microtubules وتشتت خيوط المغزل من مكانها وتسبب انقسامات شاذة لنواة حبة اللقاح.

٤- الفحم النباتى Active charcoal

إضافة الفحم النباتى بنســبة ٢٪ إلى البيئــة المزروعة بمتوك نبات التبغ يؤدى إلى زيــادة عدد الأجنة الذكرية مــن ١٥٪ إلى ٤٥٪ للصنف هافانا Havana، ومن ٤١٪ إلى ٩١٪ للصنف Badischer Burley. ويؤدى إلى زيادة عدد النباتات وسرعة نموها، ويؤدى أيضا إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية للأنيمون Anemone والشــوفان Rye والبطاطــس. وينشــط تكويــن الأجنة الذكرية لنبات الجــزر فى حالة غياب الأكســين من البيئة. وإضافة الأكسين للبيئة ينشــط تكوين الأجنة الذكرية لنبات التبــغ فــى حالة غياب الفحــم النباتى. وترجع أهمية الفحم النباتى فى تنشــيط وإنتــاج الأجنــة الذكرية لبعض الأنــواع النباتية إلى قدرته علــى امتصاص مركب 5- Hydroxymethyl furfural الناتــج من الســكروز أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وغيره من المركبات الســامة التى تســبب موت الأجنة الذكرية النامية من حبوب اللقــاح. كما أن الفحم النباتى يقــوم بتنظيم امتصاص منظمات النمو الداخلية En- dogenous والخارجية Exogenous.

طرق الحصول على أجنة أحادية من البيضة

١- زراعة بويضات غير مخصبة فى المعمل

هى وسـيلة لإنتاج نباتات أحادية تحمل صفـات الأم. ويتم ذلك بزراعة البيضة غـير المخصبة. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية من نبات *Aerva tomentosa* بزراعة البراعم الزهرية أو السنابل غير المخصبة.

٢- تنبيه المبيض باستخدام حبوب لقاح غير مكتملة الحيوية

ينشـط المبيض باسـتخدام حبوب لقاح غـير كاملة الحيوية أو مـن أنواع بعيدة القرابة. وتعريض حبوب اللقاح لجرعات مناسـبة من أشعة جاما أوالأشعة السينية يؤدى إلى خفض حيويتها بحيث يكون لها القدرة على الإنبات واختراق الميسم والقلم لمسافة محدودة ثم تموت قبل الوصول إلى الكيس الجنينى، وهذه المعاملة تعمل على تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة أحادية تحمل نصف عدد كروموسومات الأم. فإذا زرعـت الأجنـة مبكرا فى المعمل تنتج نباتات أحاديـة عقيمة لا تنتج بذورا إلا إذا تحولت إلى نباتات ثنائية بالكولشسين.

٣– تنبيه البيضة بالصدمة الحرارية Thermal shocks

قد تؤدى المعاملة الحرارية المفاجئة إلى تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة بكرية بدون إخصاب. وبزراعة هذه الأجنة تنتج نباتات أحادية. وقد تحقق ذلك بتعريض نباتات الداتـورا *Datura stramonium* إلى حرارة منخفضة أثناء الإخصاب، وتعريض نباتات التبـغ إلى حـرارة منخفضة أو مرتفعة، وتعريض نباتات الشـوفان Rye إلى ٣°م. وفى جميع هذه الحالات تكون النباتات الناتجة فى المعمل أحادية عقيمة ناتجة أصلا من البيضة وتحتوى على كروموسومات البيضة فقط. ولإنجاح هذه التجربة يجب تعريض كل من البيضة وحبة اللقاح إلى نفس الصدمة الحرارية. وتسـبب الصدمات الحرارية

المفاجئة إلى تغيير نظام انقســام نواة حبة اللقاح والبيضة. فقد وجد أن معاملة حبوب لقاح نبات *Hyoscyamus orientalis* بالبرودة فقط تفقدها القدرة على الإخصاب.

٤- تنبيه البيضة بالمعاملة الكيميائية Chemical treatment

تحدث بعض الكيماويات ظاهرة الأجنة البكرية Parthenogenesis، فلوحظ نشاط البيضة داخل الكيس الجنينى وانقســامها عدة انقســامات متتالية بعد حقن مبيض نبــات البيتونيا بمركب بلفيتــان Belvitan.، أو رش النباتات ببعض منظمات النمو مثل الإيثريل Ethrel التى تسبب عقما ذكريا ويبقى المبيض حيا ليكون ثمرة.

الإخصاب المعملى In vitro fertilization

يواجه مربو النبات بعض الظواهر مثل عدم التوافق الذاتى Self- incompatibility وعــدم التوافق الخلطى Cross-incompatibility. ويعنى ذلك عدم إنباتَ حبة اللقاح علــى الميســم وعدم حدوث إخصاب، وقــد تنبت حبة اللقاح وتخــرج منها أنبوبة لقاحية ولكنها لا تســتطيع استكمال مســارها داخل القلم وتتوقف قبل الوصول إلى المبيــض ولا يكتمل الإخصاب. وقــد يحدث إخصاب لخلية البيضة ويتكون الجنين ولكنــه يتوقف عن النمو ويموت مبكرا. ومضمون ذلك أن عدم التوافق يؤدى إلى عدم تكوين البــذور. ولم تظهر فكرة الإخصاب المعملى داخل أنبوبة اختبار قبل ١٩٦٢. وفى الواقع أن المعلومات حول الإخصاب المعملى مازالت محدودة.

طرق الإخصاب المعملى

١- إخصاب الميسم Stigma fertilization

فــى هــذه الطريقة تعقم الزهرة الخنثى تعقيما جيدا، مع الحرص بعدم ملامســة الميســم لمادة التعقيم لفترة طويلة حتى لا يؤدى إلى إزالة المادة اللزجة وعدم التصاق

حبوب اللقاح على الميسم. ويزرع المبيض المعقم على بيئة غذائية صلبة فى أنبوبة اختبار، ثم تنثر حبوب اللقاح من المتك على الميسم. وهذه الطريقة مماثلة للإخصاب الذى يتم فى الحقل. ويمكن استخدامها إذا كان المبيض يسقط مبكرا قبل النضج. ويعتبر إخصاب الميسم أفضل من إخصاب المشيمة لنبات التبغ وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع الأنواع:

Antirrhinum majus; Pisum sativum; Lathyrus odoratus; Zea mays; Glycine max; Nicotiana rustica; Nicotiana tabacum; Petunia violaeea.

٢- إخصاب المشيمة Placental fertilization

تفصل مشيمة محتوية على بويضات غير مخصبة من زهرة معقمة جيدا. ويتم ذلك تحت ستريوميكروسكوب ثم تزرع فى بيئة غذائية. وتعقم المتوك وهى فى مرحلة ما قبل الانفتاح مباشرة. وتستخدم المتوك التى تنفتح أثناء التعقيم، وينثر منها حبوب اللقاح قريبا من البويضات غير المخصبة. وينتظر حتى تنبت حبوب اللقاح وتخترق الكيس الجنينى Embryo-sac. وقد نجحت هذه الطريقة مع نباتات العائلة *Caryo-phyllaceae* والأنواع النباتية التابعة لجنس القطن *Gossypium* والذرة *Zea mays*.

عوامل إنجاح الإخصاب المعملى

- أن تكون حبوب اللقاح والبويضات فى حالة فسيولوجية وتكوينية سليمة.
- يجب أن تتغير مكونات البيئة الغذائية بتغيير مرحلة النمو ابتداء من إنبات حبوب اللقاح والإخصاب ونمو الجنين، وقد يضاف إليها بعض المعقدات الطبيعية المناسبة لكل مرحلة.
- درجة حرارة التحضين قد تكون عاملا هاما لإنجاح عملية الإخصاب، فمثلا يحتاج البنفسج *Nareissus* إلى التحضين عند أقل من ٢٥°م ويحتاج الخشخاش *Papaver somniferum* للتحضين عند أكثر من ٢٥°م.
- ينجح إخصاب المشيمة أحيانا إذا كانت النباتات تحتوى بصورة طبيعية

علـى ظاهـرة عدم التوافق الذاتى. ومن أمثلة ذلـك التهجين بين نباتات نوعين من البيتونيا : *Petunia axillaris* و*Petunia hybrids*.

– ينجح التلقيح الخلطى أحيانا حتى ولو كان غير ناجح فى الحقل. وقد تم إنتاج نباتاث هجن من نبات التبغ نوع *Nicotiana alata* بعد إخصاب البويضات فى أنبوبة اختبار بحبوب لقاح من نبات التبغ نوع *Nicotiana tabacum*.

طرق مضاعفة العدد الكروموسومى

١– تضاعف العدد الكروموسومى بدون انقسام النواة Endomitosis

الخلايا الأحادية Haploids هى خلايا غير مستقرة أثناء الزراعة المعملية، وتميل دائمـا إلى مضاعفة العدد الكروموسـومى ذاتيا بدون انقسـام للنواة، فيتضاعف عدد الكروموسومات داخل النواة وتصبح خلية ثنائية.

٢– المعاملة بالكولشسين Cholchicine treatment

يسـتخدم الكولشسـين على نطاق واسع كمانع لتكوين خيوط المغزل Spindle والصفيحة الوسـطى Middle lamella بالخلية، فيتضاعف عدد الكروسـومات بها وتصبح خلية واحدة متضاعفة ينتج عنها نبات متضاعف Polyploid. وقد تم الاسـتفادة من هذا المركب للحصول على سـلالات ثنائية متجانسـة Homozygous lines من خلال الزراعـة المعملية لخلايا أو أنسـجة أحادية العدد الكروموسـومى. ويتـم ذلك بزراعة المتوك ومعاملـة النبتات الأحادية الناتجة- وهى مازالت متزاحمة ومحاطة بجدار المتك - بمادة الكولشسـين بتركيز ٠,٥٪ ولمدة ٢٤– ٤٨ ساعة ثم تغسل جيدا بعد إخراجها من المتك ثم يعاد زراعتها معمليا بعد فصلها عن بعضهـا. كذلك يمكن معاملة النباتـات الناضجة بعجينة من اللانولين Lanolin تحتوى على ٠,٤٪ كولشسين وتضاف إلى إبط الأوراق. وعند الحصول على نباتات ثنائية خصبة متجانسة يمكن استخدامها كسلالات نقية Inbred lines تدخل بعد ذلك فى إنتاج الهجن.

□□□

الباب الثامن

زراعة البروتوبلاست Protoplast fusion

حتى عام ١٩٧٠ كانت الممارسات الوراثية في النباتات مركزة على نقل عوامل وراثية من نبات إلى آخر باستخدام التلقيح والإخصاب وإنتاج بيضة مخصبة Zygote. ويحتوى الزيجوت على كروموسومات نصفها من الأب والنصف الآخر من الأم. والكروموسومات هى الحاملة للجينات المعبرة عن الصفات الوراثية للنبات وتسمى جينات كروموسومية Chromosomal genes ومقرها النواة. ويحمل الكلوروبلاست والميتاكوندريا جينات خاصة بصفات السيتوبلازم وتسمى جينات سيتوبلازمية Cyto- plasmic genes موروثة من الأم. ويمكن نقل المادة الوراثية بدمج بروتوبلاست خليتين مهضوم جدارهما بواسطة الإنزيمات. وبعد هضم الجدار الخلوى يكون البروتوبلاست مغلفا بالبلازماليما Plasmalemma. ثم يخرج البروتوبلاست تاركا البلازماليما. وقد يكون البروتوبلاست المندمج خاصا بخليتين من الخلايا الجسمية (ثنائية Diploid) أو خاصًا بخليتين من الخلايا الجنسية (أحادية Haploid) مثل بروتوبلاست حبوب اللقاح. ويعتبر دمج البروتوبلاست من طرق الوراثة الجزيئية Molecular genetic التى تهدف إلى نقل مادة وراثية بعيدا عن استخدام التكاثر الجنسي.

النباتات التى يمكن إكثارها بالبروتوبلاست

يمكن فصل البروتوبلاست من جميع الأنواع النباتية تقريبا، ولكن لايمكن إكثارها جميعا بالبروتوبلاست. فيمكن إكثار أنواع نباتية كثيرة مثل التبغ والطماطم والبطاطس والفلفل والباذنجان التابعة للعائلة الباذنجانية *Solanaceae* وبعض الأنواع التابعة للجنس Brassica التابع للعائلة الصليبية Cruciferae وبعض محاصيل العلف For- age التابعة للعائلة البقولية Leguminasae وبعض الأنواع التابعة للعائلة الخيمية Umbelliferae. أما عن العائلة النجيلية Gramincae فيصعب تكاثرها بالبروتوبلاست

باستثناء الأرز الذى يمكن اكثاره بالبروتوبلاست. وأثبتت بعض التجارب الفردية غدم نجاح تكاثر القمح وقصب السكر والذرة والشعير والراى Rye والتريتيكال Triti-cal والسورجم Sorghum بالبروتوبلاست. بينما توجد بشائر ناجحة فى إكثار بعض نباتات الأعلاف البقولية مثل البرسيم الحجازى Alfalfa والبرسيم المصرى Clovers والتريفوال Trefoils والنباتات البقولية المنتجة للحبوب مثل فول الصويا والبسلة والفاصوليا والترمس. وبالرغم من ذلك فإنها تحتاج إلى مزيد من الأبحاث المؤكدة مع الاهتمام بخصوبة النباتات الناتجة.

مراحل إنتاج البروتوبلاست المندمج (الهجين)

١- مرحلة اختيار الجزء النباتى.

٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية.

٣- مرحلة زراعة الخلايا النباتية.

٤- مرحلة فصل البروتوبلاست.

٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست.

٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست.

٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج.

٨- مرحلة الانتخاب المعملى للطفرات.

٩- مرحلة تكوين جدر جديدة لخلايا البروتوبلاست.

١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست.

١- مرحلة اختيار الجزء النباتى

تختلف الأنواع النباتية فى استجابتها للتكاثر بالبروتوبلاست، لذلك فإن اختيار النوع النباتى المناسب له أهمية كبيرة فى انجاح التجربة. وأن يكون البروتوبلاست المندمج ثابتا وراثيا. وأن تفصل الأجزاء النباتية من نباتات جيدة النمو وخالية من

الأمراض ونامية فى المعمل أو صوبة محمية. فإذا فصلت الأجزاء النباتية من نباتات نامية خارج المعمل فيستلزم تعقيمها جيدا حتى لا يؤثر رداءة التعقيم على جودة البروتوبلاست.

ويفصل البروتوبلاست من أنسجة نباتية عديدة بصرف النظر عن مرحلة نموها مثل القمم النامية للأفرع والبادرات والفلقات والسويقة الجنينية Hypocotyl والأنسجة الخازنة للدرنات والكورمات والفلقات وغيرها.

وتفضل الأوراق الخضراء حديثة العمر المغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكل لسهولة هضم الجدر الخلوية بالإنزيمات وتحقيق أعلى عائد من البروتوبلاست. بينما أنسجة الأوراق البالغة تكون ملجننة ويصعب هضمها بالإنزيمات وتعطى عائدا أقل من البروتوبلاست. وتعتبر خلايا الميزوفيل Mesophyll فى الورقة من المصادر الهامة للبروتوبلاست لقدرتها على التمثيل الضوئى. وتعتبر مزارع الخلايا المعلقة مصدرا هاما للحصول على البروتوبلاست لأنها خلايا نشطة فى الانقسام، ولها قدرة عالية للتطور وتكوين جدر خلوية جديدة. وعند فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة يجب اختيار الخلايا التى تكون فى مرحلة نمو واضحة وتكون ذات جدر رقيقة غير مغلظة. ولا يفضل أحيانا استخدام الكالس أو الخلايا المعلقة لعدم ثباتها وراثيا، مع أن التغييرات الوراثية لها أهمية كبيرة عند مربى النباتات واستحداث الطفرات.

٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية

يفصل البروتوبلاست باستخدام مجموعة من الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. ويمكن التعرف من الدراسات السابقة على الإنزيمات المناسبة لهضم جدر الخلايا لكل نوع من النباتات وتحديد التركيز المناسب لكل إنزيم ومدة المعاملة، وقد يستلزم إجراء تجارب للحصول على هذه المعلومات. ويجب التعرف إلى مكونات الجدار الأولى للخلية، حيث تختلف مكوناته باختلاف نوع الخلية ومصدرها إن كانت من نباتات ذات فلقتين أو ذات فلقة واحدة. ويتركب الجدار الأولى

فى جميع النباتات أساسـا من مواد غروية محبة للماء شـاملة البروتين والسـليلوز والهيميسلسـولوز. وفى خلايا نباتـات الفلقتين يكون السـليولوز والألياف مغطى بطبقـة واحدة من الهيميسـليلوز Hemicellulose مرتبطا بالزيلوجلوكان -Xyloglu can. ويرتبط الهيميسـليلوز والألياف بمـواد بكتينية مرتبطة بالزايلوجلوكان. بينما فى خلايا نباتات الفلقة الواحدة يكون الهيميسـليلوز مرتبطا بأرابينوزيلان -Arabi noxylan. وعلى ذلك يتطلب استخدام خليط من الإنزيمات يتكون من محلول مركز من Cellulase لتفكيك وتحليل الجدار الأولى للخلية وPectinase لفصل الخلايا من الطبقة الوسطى للأوراق النباتية. وتأثير هذين الإنزيمين فى صورتهما الطبيعية أقوى من الإنزيمات الصناعية. وهذا يدل على احتواء الإنزيم الطبيعىالخام على مركبات وإنزيمات أخرى لها أهميتها فى تحلل الجدار الأولى. ويسـتخلص السـليوليز من فطر *Myrothecium verrucaria* وحشرة *Trichoderma viride*. ويستخلص البكتينيز Pectinase مـن فطر *Rhizopus*. ويسـتخلص معقد إنزيمىمن فطر *Basidiomycete* لـه القدرة على إذابة الجدار الخلوى لبعض الأنـواع النباتية بفاعلية كبيرة. ويقوم إنزيم الهيميسليوليز بإذابة الجدار الخلوى بنجاح. ويستخلص خليط من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية من الطحالب. ويسـتخدم عادة خليط من السـليوليز لإذابة السـليولوز Cellulose والبكتينيـز لإذابة البكتين Pectine والهيميسـليوليز لإذابة الهيميسليولوز. وتحقق بعض الإنزيمات الصناعية نجاحا فىذلك. وبالرغم من ذلك يتميز العديد من الخلايا بأن لها جدرا ثانوية مقاومة لفعل هذه الإنزيمات ويصعب تحليلها إنزيميا ويصعب فصل البروتوبلاست منها. وقد يكون لمعقد الإنزيمات الخام تأثيرات غير مرغوبة على البروتوبلاسـت المسـتخلص بفعل الآثار الجانبية للمواد الأخرى الداخلة فى تركيبه. فقد تسـبب هـذه الإنزيمات انفجار الخلايا المنتفخة Turgid وخروج البروتوبلاسـت بسـرعة كبيرة مما يؤدى إلى موتها ، خصوصا إذا تعرضـت الخلايا المنتفخـة للإصابة بمرض العفن الطـرى Soft rot. أما إذا كانت الخلايا متبلزمة فإن البروتوبلاست يبدى مقاومة أكبر لهذه الإنزيمات وتكون سرعة خروجـه أقل. لذلك يفضل تعريض الأنسـجة النباتيـة المصابة بالأمراض إلى حالة

البلزمة قبل تعريضها للإنزيمات لتقليل الضرر المتوقع على البروتوبلاست. ويجب التخلص من الأملاح الموجودة طبيعيا في مستخلص الإنزيمات، وذلك بوضعه في عمود Biogel P6 Column مقاسه ٤٠ × ٢,٥ سم ثم يغسل العمود بإضافة ٥ ملليلتر من الماء حتى تفصل الأملاح تدريجيا من المستخلص. ثم تجمع الجزيئات المتبقية مع بعضها وتجفف بالتجميد Freeze dry، وتضاعف هذه الطريقة فاعلية الإنزيم في فصل البروتوبلاست بسرعة. وقد ثبت نجاح هذه الإنزيمات في فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة.

٣- مرحلة زراعة الخلايا النباتية

يفضل زراعة الخلايا في بيئة سائلة لاستخلاص البروتوبلاست منها وإمكان التحكم في مكونات البيئة الغذائية والبيئة المحيطة أثناء التحضين. كما تساعد البيئة السائلة على ترشيد استهلاك الإنزيمات الهاضمة وتوفير قدر كبير منها وتساعد على تفكك الأنسجة وزيادة عدد الخلايا المنفردة في البيئة بسبب انتشار الإنزيمات بين الخلايا وإذابة الجدر الخلوية وتحرير البروتوبلاست منها بسهولة. والبروتوبلاست الناتج من البيئة السائلة يتأقلم بسرعة للزراعة المعملية ولا يحتاج إلى تعقيم. وقد تتعرض الخلايا للبلزمة أثناء فصل البروتوبلاست وتحدث لها أضرار شديدة. لذلك توضع الخلايا المفككة في محلول منظم للضغط الأسموزي، ثم يضاف المحلول المنظم المحتوي على الخلايا إلى محلول الإنزيمات لضمان استقرار البروتوبلاست وعدم انفجاره. ويجب تحديد التركيز المناسب من المحلول المنظم ومتابعة أثره على سلامة البروتوبلاست أثناء خروجه من الخلية والحصول على أكبر كمية منه. ويستخدم الجلوكوز والسكروز والمانيتول والسوربيتول كمركبات لضبط الأسموزية عند ٧٠٠ –٨٠٠ ملليموز. وتسبب المعاملة الخطأ انخفاض حيوية البروتوبلاست.

٤- مرحلة فصل البروتوبلاست

خطوات فصل البروتوبلاست

١- تزرع الأجزاء النباتية المعقمة فى دوارق سعة ٢٥٠ ملليلتر تحتوى كل منها على ٩٠ ملليلتر بيئة سائلة للحصول على كالس. وتجدد زراعة الكالس فى بيئة سائلة طازجة ثلاثة مرات، بين كل فترة وأخرى ٤ أيام، للحصول على كمية كبيرة من البروتوبلاست. والتأخير فى استخلاص البروتوبلاست يقلل كميته.

٢- تثبت الدوارق على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٢٤ دورة/ دقيقة لمدة ١٠- ١٤ يوما، بعدها تقسم البيئة بكل دورق على ثلاثة دوارق جديدة بمعدل ٣٠ مللى/ دورق. ويضاف بيئة سائلة طازجة ليصل حجمها ٩٠ مللى/ دورق. ثم ترفع الدوارق من الهزاز وتترك لترسب الخلايا إلى القاع. ويتم التخلص من الجزء العلوى من البيئة السائلة. ثم ينقل الجزء السفلى المحتوى على الخلايا المترسبة إلى دورق آخر سعة ١٠٠ ملليلتر.

٣- يضاف إلىمعلق الخلايا خليط من إنزيمات معقمة بواسطة مرشحات تعقيم. ويحتوى الخليط على ٣٪ Driselase + ٠,٠٥٪ Pectic Acid Transe Lim- (PATL) inase + ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW. وتضبط الحموضة عند pH 5.6. ويضاف خليط الإنزيمات بمعدل ٢٠ ملليلتر/ دورق. ويفضل أن تتم المعاملة الإنزيمية بسرعة. ثم تحضن عادة فى ظلام عند ٢٧°م بعد تثبيت الدوارق على هزاز يعمل بسرعة ٧٢ دورة/ دقيقة لمدة ٢- ٢,٥ ساعة.

٤- يضاف إلى خليط الإنزيمات ٢٥ ملليلتر من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول وأملاح CPW.

٥- ينقل المحلول المحتوى على خلايا وبروتوبلاست إلى أنابيب اختبار تحتوى على غطاء محكم الغلق وتثبت على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء العلوى من البيئة الغذائية ويضاف بدلا منه حجم صغير من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW.

٦- يمرر المحلول بأكمله خلال منخل من النايلون الخشـن للتخلص من البقايا الكبـيرة مـن حطام الخلايا، ثم يمـرر مرة ثانية خلال منخل نايلـون ناعم (٠,٦٤ ميكروميـتر) للتخلص مـن البقايا الأصغر حجما. ثم يحمل الراشـح المحتوى على خلايا وبروتوبلاست على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء الطافى.

٧- يضاف إلى الخلايا والبروتوبلاسـت محلول يتكون من ٢١٪ سكروز + أملاح. CPW ويعاد تحميل الدوارق على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق لتجميع البروتوبلاست فى الجزء العلوى من السائل بينما تهبط الخلايا وحطامها إلى القاع. ويسـحب البروتوبلاسـت بماصة باستير وينقل إلى بيئة غذائية. ويؤخذ جزء بسيط من المخلوط للفحص وتحديد كمية البروتوبلاست المفصول.

وبهذه الطريقة يمكن فصل ٢,٥ x ١٠^{٦} خلية بروتوبلاسـت بكل دورق سعة ٢٥٠ ملليلتر. وبزراعة البروتوبلاسـت بتركيز ٢,٥ x ١٠^{٤}/ ملليلتر فى بيئة سائلة تحتوى علـى أملاح العناصر الغذائية + ٢ ملليجرام/ لتر NAA تركيز + ٠,٥ ملليجرام/ لتر BAP + ٩٪ مانيتول يبدأ البروتوبلاست فى النمو بكفاءة عالية .

مكونات أملاح (CPW):

- فوسفات بوتاسيوم ثنائى الإيدروجين KH_2PO_4 بتركيز ٢٧,٢ ملليجرام/ لتر.
- نترات بوتاسيوم KNO_3 بتركيز ١٠١ ملليجرام/ لتر.
- كلوريد كالسيوم $CaCl_2.2H_2O$ بتركيز ١٤٨٠ ملليجرام/ لتر.
- يوديد بوتاسيوم KI بتركيز ٠,١٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات ماغنسيوم $MgSO_4.7H_2O$ بتركيز ٢٤٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات نحاس $CuSO_4.5H_2O$ بتركيز ٠,٠٢٥ ملليجرام/ لتر.

(أ) استخدام خليط الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

١- تزرع بذور التبغ فى ظلام تام وحرارة ٢١°م لإنتاج بادرات. ثم تنقل البادرات إلى صوبـة زجاجية تحت ظروف إضاءة شـدتها ٩٠٠٠ لكس لمدة ١٦ سـاعة يوميا

وحـــرارة ٢٥– ٢٨°م. تنقــل النباتات إلى إصص قطر ١٢ ســم تحت إضاءة ١١ ألف لكس. وتروى النباتات بالنشع من أسفل الأصيص.

٢– تجمــع الأوراق كاملــة التمدد بعــد ٦٠ يوما من الإنبات. ثم تعقم الأســطح الخارجية للأوراق بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم التجارى، ثم تغســل عدة مرات بماء معقم لإزالة الآثار المتبقية من مادة التعقيم. ثم تترك الأوراق حتى تذبل ويترهل قوامها، ثم تزال وتستبعد بشرتها السفلى، ثم تقطع الأوراق إلى أجزاء صغيرة وتفرد فى أطباق بترى ١٤ســم، ويضاف إلى الأجزاء الورقية محلول مانيتول بتركيز ١٣٪ يحتــوى علــى أملاح (CPW) بعد ضبــط حموضته عند pH 5.8 باســتخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٥ عيارى.

٣– يسحب محلول المانيتول وأملاح (CPW) من أسفل الأوراق المجزأة بعد ١– ٢ ســاعة، ويوضع بدلا منها ٢٠ ملليلتر من خليط إنزيمات معقمة بمرشــحات التعقيم يشــمل ٤٪ Maccrozyme + ١٣٪ Mannitol + ٤٪ Meicelase + أمــلاح CPW وتضبط الحموضة عند pH 5.8. ثم يحضن الخليط والأوراق المجزأة لمدة ٨ ســاعات عند ٢٧°م وظلام تام مع تحريك الأوراق بملقط لتســهيل خروج البروتوبلاســت. ثم يترك البروتوبلاست فى نفس الظروف لمدة ٣٠ دقيقة، ثم تستبعد الإنزيمات بماصة باستير Pasteur pipette.

٤– ينقل البروتوبلاســت إلى أنبوبة اختبار لها غطاء محكم ويضاف إليه محلول المانيتــول وأمــلاح CPW. ثم تثبت الأنابيب على جهاز طرد مركزى يعمل بســرعة ٣٥ دورة فى الدقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم تستبدل البيئة بمحلول ٢٠٪ مانيتول وأملاح CPW. ثــم تثبــت الأنابيب مرة ثانية على جهاز الطرد المركزى يعمل بســرعة ٥٠ دورة/ الدقيقــة ولــدة ١٠ دقائق، يطفو بعدها البروتوبلاســت على الســطح حيث يســحب بماصة باســتير. ثم يضاف إليه ١٠ ملليلتر بعد فصله من محلول المانيتول وأملاح CPW وتؤخذ منها عينات للفحص. ويلاحظ أن حطام الخلايا تستقر فى قاع الأنابيب حيث تستبعد بعد رفعها من جهاز الطرد المركزى.

(ب) استخدام تعاقب الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

تستخدم هذه الطريقة فى دراسة الفيروسات التى تصيب أوراق نبات التبغ. وتتلخص فى اختيار نباتات عمر ٦٠- ٧٠ يوما نامية فى أصص عند ٢٢- ٢٥°م وشدة إضاءة ١٠- ١١ ألف لكس، وفترة إضاءة ١٦ ساعة يوميا من مصابيح فلوروسنت بيضاء. ويفصل البروتوبلاست من أوراق غير مكتملة الانبساط بطول ٢٠- ٢٥ سم، تقع بين الورقة السادسة والتاسعة من قمة النبات. وتتلخص هذه الطريقة فيما يلى:

تعقم الأوراق ثم تغسل بالماء المقطر المعقم للتخلص من بقايا مواد التعقيم، ثم تستبعد البشرة السفلية.

تقطع الأوراق منزوعة البشرة السفلية إلى قطع، وتوضع فى٢٠ ملليلتر من محلول معقم بفلتر تعقيم يحتوى على ١٣٪ Mannitol + ٩٪ Macerozyme + ١٪ Potassium dextransuphate، وتضبط حموضته عند pH 5.8 باستخدام حمض هيدركلوريك تركيز ٢ عيارى، ويساعد هذا المحلول على ذبول الأجزاء الورقية. ثم يحمل المحلول المحتوى على الأوراق المجزأة على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٠٠- ١٢٠ دورة/ الدقيقة عند حرارة ٢٥°م.

تجمع الخلايا المفصولة من الأجزاء الورقية منزوعة البشرة على مراحل بعد ٣٠، ٧٥، ١٢٠، ١٨٠ دقيقة من بدء عمل الهزاز، على أن تستبدل البيئة الغذائية بعد كل فترة زمنية ببيئة مماثلة طازجة. مع ملاحظة أن المرحلتين الأخيرتين من تجميع الخلايا محتوية على خلايا برانشيمية.

توضع الخلايا فى جهاز طرد مركزى سرعته ١٠٠- ٢٠٠ دورة/ الدقيقة لمدة ٢- ٣ دقيقة، ثم تغسل مرتين بمحلول مانيتول حديث التحضير بتركيز ١٣٪ ويعاد وضعها فى جهاز الطرد المركزى.

بعد الخطوات السابقة توضع الخلايا المفصولة فى ٤٠ ملليلتر من إنزيم Cellulase الخام بتركيز ٤٪ مضاف إليه ١٣٪ مانيتول، وتضبط الحموضة عند pH 5.8 باستخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عيارى قبل التعقيم بمرشحات التعقيم. ثم

تحضن الخلايا المعلقة عند ٣٦°م لمدة ٣- ٣,٥ ساعة مع مراعاة وجود قضيب يتحرك بصورة محورية لمنع تكتل وتجمع الخلايا خلال فترة إزالة الجدار الخلوى.

بعـد انتهاء الفـترة الزمنية المحددة تنقل الخلايا مع البيئـة الغذائية إلى جهاز طرد مركزى مرة ثانية يعمل بسـرعة ١٠٠ دورة/ الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة. تغسل بعدها مرتين بمحلول المانيتول تركيز ١٣٪ مضاف إليه كلوريد الكالسيوم تركيز ٠,١ ملليمولر. ويعاد تثبيتها مرة ثانية على جهاز طرد مركزى كما فى المرة السابقة، بعد ذلك يتم فصل البروتوبلاست باستخدام ٥ ملليلتر من المانيتول.

(جـ) فصل بروتوبلاست من أنسجة غير ورقية

يفضل فصل البروتوبلاست من أنسجة ورقية ولا يفضل استخلاصه من أنسجة أخرى. وقد يرجع ذلك إلى صعوبة تحديد التركيب الإنزيمى المناسـب لفصل البروتوبلاست من هذه الأنسـجة. وصعوبة تغلغـل الإنزيمات بين الخلايا. ويمكن فصل البروتوبلاسـت من الخلايا البرانشـيمية وغيرها باسـتخدام نفس الإنزيمات المذكورة سابقا إذا كان لها جدار خلوى رقيق. ويسـتلزم اسـتخدام كميات كبيرة من إنزيـم Pectinase عند فصل البروتوبلاسـت من الثمار المحتوية على نسبة عالية من البكتين. ويمكن الحصول على البروتوبلاست من حبوب اللقاح باسـتخدام إنزيم Helicase المحضر بطريقة التجفيف بالتجميـد حيث يتميـز باحتوائه علـى إنزيـم B 1-3 Gglucanase ذى القدرة العالية علـى هضم مـادة الكالوس Callose الموجـودة فى الجدار الخلوى، ووجود ترسـيبات كبيرة من مادة Sporopollinin على جدر حبوب اللقاح يكون سـببا لإعاقة اسـتخلاص البروتوبلاست منها بواسطة الإنزيمات.

٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست

بعد الحصول على البروتوبلاسـت، يرشـح خلال مناخل ٣٣- ١٠٠ ميكروميتر مـن الصلب أو النيلـون للتخلص من بقايا جدر الخلايا وغيرها. ثم يحمل الراشـح

على جهاز طرد مركزى يعمل بسـرعة منخفضة مع التكرار بعد إضافة محلول ٢١٪ سـكروز، حيث إن الطرد المركزى السـريع يحدث أضرارا شـديدة للبروتوبلاست لرقته. ثم يجمع البروتوبلاسـت المتكتل على السـطح. ويراعـى أن وجود منظمات نمو مختلفة فى البيئة تسـبب تغييرا فى عملية البناء الضوئى للبروتوبلاست، ومنع تكويـن جدر خلوية جديدة ونمو الخلايا. وقد يتغير شـكل البروتوبلاسـت ويصبح غير كروى ويسـتمر ذلك لمدة طويلة. فإذا توفرت الظروف المناسـبة تنقسـم خلايا البروتوبلاسـت، وقد يكون الانقسام فى المرحلة الأولى مضطربا غير متناظر أو شاذ، وربمـا يرجع ذلك إلى فقد مواقع المعلومات بالخليـة Information positions نتيجة تدهور شـبكة البلازمودزماتـا Plasmodesmata. وبذلك يتدهور الاتصال بين الخلايا ويتغـير النظـام الهيكلى للخليـة Cytoskeleton pattern، ويحـدث تغيير فى نظام الإمداد بالعناصر وفى حجم ومسـاحة أسطح الخلايا، ويتوقف التيار السيتوبلازمى Cytoplasmic stream لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة بعد فصل النسيج.

أسباب انخفاض محصول البروتوبلاست من الخلايا

بالرغم من توفر الظروف المثلى فإن أكبر كمية مستخلصة من البروتوبلاست حوالى ٣٠٪. وأسباب ذلك:

١- مقاومة جدر الخلايا إلى فعل إنزيم Cellulase. ولذلك يمكن اسـتخدام أنواع مختلفة مـن الإنزيمات مثل Maccrozyme R10; Onosuka R10; Driselase. ويعتبر أفضل تركيز لإنزيم Cellulase R10 هو ١٪، وأفضل تركيز لإنزيم Macerozyme R10 هو ٠,٢٪.

٢- سـرعة موت خلايا عديدة بعد نقلها من بيئة غذائية إلى بيئة أخرى عند رفع الضغط الأسموزى للخلايا من أجل تحرير البروتوبلاست من الجدر الخارجية للخلايا. وقد يستخدم السكروز بدلا من المانيتول بهدف زيادة الضغط الأسموزى، بالرغم من أن السـكروز يؤدى إلى خفض كمية البروتوبلاسـت المستخلصة بصورة واضحة جدا.

٣- تتأثر كمية البروتوبلاســت المســتخلصة من الخلايا المعلقة والأنسجة النباتية بمرحلة النمو. وتعتبر مرحلة الانقسام السريع للخلايا المعلقة فى البيئة الغذائية هى أفضل المراحل بالمقارنة بمرحلة الثبات العددى للخلايا، وثبت أن هذه الفترة كانت بعد ٤- ٥ أيام من الزراعة المعملية لنبات التبغ.

٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion

خاصية اندماج البروتوبلاست

يتميز البروتوبلاســت بقدرته على الاندماج الذاتى والتكتل، ويمكن الاســتفادة من هذه الخاصية فى دمج بروتوبلاست خلايا جسمية نباتية وإنتاج خلايا هجينية منها. وتختلف ســرعة الاندماج والتكتل باختلاف النوع النباتى. فقد يندمج البروتوبلاست بعد فصله مباشرة إذا تعرض لبعض العوامل الطبيعية. وقد يحتاج بعض الوقت حتى يندمج. وقد تنخفض قدرته على الاندماج والتكتل تدريجيا بمرور الفترة الزمنية عقب فصلــه. لذلــك يفضل تحديد الفترة الحرجة لكل نوع نباتى، وهى الفترة الزمنية التى يقضيها البروتوبلاســت المفصول قبل اندماجه. ويؤدى الفصل البطىء للبروتوبلاســت إلى حدوث اندماج بين خلايا النسيج الواحد، وهو ما يسمى بالاندماج الذاتى للخلايا Spontaneous fusion، ويحدث الاندماج الذاتى أثناء هضم الجدار الخلوى باستخدام الإنزيمات. حيث تبدأ الخيوط البلازميدية Plasmodesmata التى تربط الخلايا ببعضها بالتمدد والزيادة فى الحجم والانتشــار فى مســاحة أكبر مما يسمح بانتقال محتويات خليــة إلى خلية أخرى مجاورة لها. وعلى هذا الأســاس فــإن ظاهرة الاندماج الذاتى تعتمد على صفات الأنســجة النباتية ودرجــة تعقيدها. ولا يكفى وجود التقارب بين البروتوبلاست لحدوث الاندماج بل يتطلب أيضا أن تكون الشبكة البلازميدية متقاربة وعلــى بعــد أقل من واحد ملليمتر. والبروتوبلاســت المفصول مــن خلايا معلقة يكون غنيا بالســيتوبلازم ويكون أكثر قابلية على الاندماج بالمقارنة بالبروتوبلاست المفصول مــن الطبقة الوســطى للورقة، وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاســت الطبقة الوســطى

للورقة يحتوى على طبقة رقيقة من الســيتوبلازم حول الفجوة العصارية كبيرة الحجم بجانب وجود جسيمات أخرى مثل الكلوروبلاست. وبالفحص المجهرى تظهر بعض التغييرات فى البروتوبلاست عقب فصله مباشرة مثل وجود بروتوبلاست يحتوى على نواتين Nucleus، وقد يرجع ذلك إلى أن الخلية أثناء فصل البروتوبلاســت كانت فى مرحلة انقسام أو فىأطوارها النهائية من الانقشام.

أهداف اندماج البروتوبلاست

بإزالة جدر الخلايا يصبح البروتوبلاست عاريا وقابلا للتداول لعديد من الممارسات المعملية والوراثية مثل:

١- اندماج مجموعتين كاملتين من المجموعات الكروموســومية Genomes وإنتاج هجين منهما.

٢- نقــل جزء من المجموعة الجينية من بروتوبلاســت واهب إلى بروتوبلاســت مستقبل لإنتاج هجن غير متناظرة جزئيا Partial asymmetric.

٣- نقــل جســيمات Organells (يســمى هجــين ســيتوبلازمى Cybrid) مثــل الكلوروبلاست والميتوكوندريا بهدف نقل صفة معينة مثل مقاومة المبيدات أو مقاومة الحشائش أونقل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى.

طرق دمج البروتوبلاست (تهجين البروتوبلاست)

١- الاندماج باستخدام مركبات كيميائية Chemically- induced fusion

لتشجيع اندماج البروتوبلاست، يجب أن تكون الأغشية البلازمية Plasma mem-branes فى تلامس تام. ونظرا لوجود شــحنة سالبة على سطح البروتوبلاست تعمل على حدوث تنافر بين البروتوبلاست المتجاور، لذلك يجب التخلص من الشحنات الســالبة لمنع التنافر بين البروتوبلاســت المتجاور ويتم الاندماج بسهولة. وتستخدم وســائل عديدة تعمل على تغيير الشحنات الســالبة، منها تغيير الحموضة (pH) أو

إضافة كاتيونات متعددة Polycations أو نزع الماء Dehydration من البروتوبلاست. وقد وجد أن تعريض بروتوبلاست الطبقة الوسطى للورقة إلى بيئة تميل إلى القلوية- تحتوى على أيونات كالسيوم- يؤدى إلى تكوين أعداد كبيرة من البروتوبلاست المندمج، وكانت أفضل النتائج عندما تعرض البروتوبلاست إلى محلول منظم Buffer solution (pH 10.5) والتحضين عنده ٣٧°م ولمدة ١٠- ١٥ دقيقة. ويجب ألا تطول مدة التعريض عن ٤٥ دقيقة حتى لا يؤدى إلى تكوين بروتوبلاست غير ثابت وغير متماسك. واستخدمت هذه الطريقة بنجاح فى إحداث الاندماج والتهجين فى خلايا جسمية لنبات البيتونيا.

ويعتبر مركب Polyethylene glycol (PEG) (الوزن الجزيئى ١٥٠٠- ٦٠٠٠ دالتون) من أكثر المركبات استخداما فى الاندماج الكيميائى للبروتوبلاست. وإضافة هذا المركب بجرعات متتالية إلى معلق البروتوبلاست يؤدى إلى تجمعه Agglutination بنسبة ١- ١٠٪، ثم يتبع ذلك التخلص من هذا المركب بإضافة محلول منظم حموضته (pH 9 -11) يحتوى على نسبة مرتفعة نسبيا من أيونات الكالسيوم (١٠- ١٥ ملليمول). وميكانيكية هذا الاندماج قد تكون ناتجة عن حدوث انتشار جانبى للبروتينات الملاصقة للأغشية وخلق مناطق غنية فى الليبيدات غير مستقرة تؤدى إلى الاندماج. وقد لا تؤدى طرق الاندماج الكيميائى إلى النتيجة المتوقعة وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية لا يتحمل التعرض للمركب (PEG). كذلك يختلف تأثير هذه المادة فى التخلص من الشحنات السالبة الموجودة على سطح البروتوبلاست باختلاف وزنها الجزيئى وتركيزها وكثافة البروتوبلاست فى البيئة الغذائية ودرجة حرارة التحضين وكثافة الشحنات الموجبة المضافة للبيئة. وقد ثبت أن مادة (PEG) ذات الوزن الجزيئى ١٥٤٠ هى الأفضل من استخدام أوزان جزيئية أقل أو أعلى من ذلك، وتستخدم بتركيز لايقل عن ٣١٪ وتحضن عند ٣٥°م ثم ١٥°م. كذلك ثبت نجاح طريقة تكتل بروتوبلاست الجزر وثلاثة أنواع من التبغ وهم *N. stocktonii; N. tabacum N. nesophila;* باستخدام الفصل الإنزيمى ثم تعريض البروتوبلاست المفصول لجهاز مميز الخلايا "Cell Storter - Flow Cytometer" عند

طول موجة ٥١٤ نانوميتر وإشـعاع ضوئى مرئى مقداره «400 mW» باستخدام فلاتر LP 590; FT 560; BG 38; LP 510 ممـا يـؤدى إلى تحفيـز الاندماج بنسـبة كبيرة. ويسـتخدم الدكسـتران Dextran بنجاح مع بروتوبلاست نباتات *Petunia hybrida ; Brassica pekinensis; Nicotiana tabacum* لدمجهـا مع بروتوبلاسـت الجزر، ويتم ذلك فى الخطوات الآتية:

– يسـتخلص بروتوبلاسـت النباتات الثلاثة المذكورة وكذلك بروتوبلاست نبات الجزر كل على حدة.

– يخلـط ١٠ ملليلـتر من بروتوبلاسـت الجزر مع مقدار مسـاو لـه من أى من البروتوبلاسـت الثلاثة، ثم يكرر ذلك مع بروتوبلاست الأثنين الآخرين، ثم يوضع كل خليط منهم فى محلول ٠,٥٥ مولر مانيتول.

– ينقـل ٠,٤ ملليلـتر من بيئة الاندماج (متكونة من ١٥٪ دكسـتران Dextran+ واحـد مولـر كلوريد صوديوم لكل طبق بترى بلاسـتيك يحتوى علـى ٠,٢ ملليلتر بروتوبلاست. ثم يضاف لكل طبق بترى ٠,٤ ملليلتر من بيئة الإندماج مرة ثانية. ثم تحضن الأطباق عند ٣٠°م لمدة ١٥ دقيقة، بعدها يضاف ٠,٢ ملليلتر كلوريد صوديوم تركيـز ١,٣٦ مولر. وبعد مـرور ١٥ دقيقة أخرى يتم تخفيـف المحلول بإضافة ٥ ملليلتر بيئة غذائية مضافا إليها مانيتول تركيز ٠,٢٧ مولر ومواد أخرى غير عضوية بتركيز ٠,١٣ مولر. ثم يحضن الخليط عند ٥°م لمدة سـاعة واحدة فقط، بعدها تنقل إلى الغرفة العادية. وبعد ٢٤ ساعة يجمع البروتوبلاست ويفحص.

٢- الاندماج الكهربائى Electrofusion

(أ) المرحلة الأولى

يوضع البروتوبلاسـت فى بيئة غذائية منخفضة التوصيل الكهربائى بين قطبين كهربائيـين Two electrodes وتردد مرتفع بين القطبين (0.5-1.5 Mhz). وبواسـطة «فصـل كهربائى ثنائيـة» Dielectrophoresis على جهاز الكتروفوريسـيس تصبح

الشحنة على سطح البروتوبلاست مستقطبة وكأنها ثنائية القطبين Dipoles. وأثناء هجرة البروتوبلاست على طول خطوط المجال الكهربائى تتلامس مع بعضها وتكوين ما يسمى سلاسل اللؤلؤ Pearl chains موازية لخطوط المجالات الكهربائية المستخدمة. ويتوقف طول السلاسل على كثافة البروتوبلاست وقوة المجال الكهربائى وطول مدة تطبيق المجال الكهربائى. ويفضل استخدام مجالات كهربائية متجانسة Uniform fields بين الإلكترودات Electrodes بينهما مسافات حوالى ٥ ملليمتر، حيث تهاجر خلايا البروتوبلاست نحو هذه الإلكترودات، وتتكون عليها سلاسل مركزة من البروتوبلاست غير مشتته إلى إلكترودات أخرى وبكميات كبيرة بحيث يسهل ملاحظتها والتعامل معها. وتستخدم عادة خمسة إلكترودات متوازية مصنوعة من الصلب غير قابل للصدأ مثبتة فى وعاء من البرسبكس Perspex حجمة ٥,٠ملليلتر. ومن الممكن أن تندمج ٠,٥– ١ x ١٠^٦ بروتوبلاست فى الدورة الواحدة التى تستغرق ٦٠– ٩٠ ثانية. ومن الممكن أيضا استخدام بدائل للإلكترودات وخلايا كهربائية مغايرة للتصميم المذكور. وقد وجد أن النسبة الكلية المندمجة تصل إلى ٦٠٪ فى خليط مكون من عشيرتين من البروتوبلاست بنسبة ١ : ١. ولوحظ أن ٥٠٪ من هذه النسبة يحدث بها اندماج بنسبة ١ : ١ داخلى بين خلايا عشيرة واحدة متماثلة و٥٠٪ يحدث اندماج بين خلايا العشيرتين مكونة خلايا هجينية خليطة النواة Heterokaryons.

(ب) المرحلة الثانية

تعريض سلاسل البروتوبلاست إلى نبضات كهربائية مباشرة بجهد (3–1 kVcm-1) وقصيرة ما بين ١٠– ٢٠٠ ميكروثانية كافية لإحداث ثقوب Electro-poration فى الغشاء المحيط بالبروتوبلاست والأغشية التى فى تماس مع بعضها وبذلك يسهل دمج البروتوبلاست. ومن الممكن إدخال DNA وجسيمات أخرى إلى البروتوبلاست مباشرة. ويستخدم جهاز إطلاق النبضات الكهربائية Capacitor discharge "spike" pulses لدمج البروتوبلاست. وتتميز طريقة الاندماج الكهربائى

للبروتوبلاســت بتفوقها على الطريقة الكيميائية. وأن البروتوبلاســت المتلاصق فى سلاســل هو المســتهدف. كما يمكن توليد ومضات ذات جهــد كهربائى مختلف، ويمكن عد البروتوبلاست المندمج.

العوامل المؤثرة فى اندماج البروتوبلاست

– مصدر البروتوبلاست، إن اندماج البروتوبلاست المفصول من أوراق النوع البرى للبطاطس Solanum brevidens أســرع من اندماج البروتوبلاســت المفصول من معلق خلايا نفس النوع المؤقلم للزراعة التقليدية.

– الومضات الطويلة للجهد الكهربائى (الفولت) الأعلى تحقق اندماجا أكثر.

– البروتوبلاســت كبير الحجم أســرع فى الاندماج من صغير الحجم. وسلاســل البروتوبلاست الأطول تعطى اندماجا متكررا أكثر من السلاسل القصيرة. لذلك يعامل البروتوبلاســت الأصغر حجما مسبقا بمادة Spermine لكى يعمل على زيادة مساحة أغشية البروتوبلاست المتماسة وتجمعة فى سلاسل.

– يعمل كلوريد الكالســيوم على زيادة نســبة الاندماج بإزالة الشــحنات السالبة على أسطح البروتوبلاست، بينما مادة نترات الصوديوم المستخدمة أحيانا فى إزالة الشحنات السالبة تحقق نتائج أقل كثيرا. لذلك يفضل احتواء بيئة الاندماج Fusion medium علــى مانيتول Manitol + واحد ملليمولر كلوريد كالســيوم $CaCl_2$. وبهذه المعاملة يرتفع نسبة اندماج البروتوبلاست من ٣٠٪ إلى ٦٠٪.

– يحــدث الدمج عــادة بالتحضين فى تركيز مرتفع من مركــب (PEG) وتركيز مرتفع من أيونات الكالسيوم (Ca^{++}) ورقم حموضة مرتفع نسبيا (يميل إلى القلوية). وهذه المعاملة ضرورية لإزالة الشحنات السالبة الموجودة على البروتوبلاست. على أن يتم التخلص من آثار المخلوط (PEG) و(Ca^{++}) بالغسيل بعد إتمام الاندماج. والمتوقع نجاحــا عظيمــا لطريقة الدمج الكهربائى، حيث تــؤدى إلى الحصول على كثير من البروتوبلاست الحى أكثر من استخدام مركب (PEG). كما حقق دمجا للبروتوبلاست باستخدام مركب Dextran ومنشط كهربائى.

٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج

Selection of somatic hybrid cells

● **عـزل مباشر تحت ميكروسكوب** Direct isolation

تشـفط الخلية الهجينيـة المندمجة بماصة ميكرومتريـة Micropipett أو بأنبوبة شعرية Micro capillary متصلة بسرنجة Syringe لها قلاووظ محكم. وتشفط الخلايا ذات الأنوية المندمجة Heterokaryons واحدة بعد الأخرى تحت ميكوسكوب ضوئى. وبالرؤية المباشـرة يمكن بسهولة تمييز البروتوبلاست الهجين من بين بروتوبلاست الأوراق وبروتوبلاست الخلايا المعلقة.

● **الرؤى بالعين** Visual method

أحيانـا يمكن تمييز الخلايـا الهجينية ذات الأنوية المندمجـة بالعين المجردة إذا كانـت متميزة بصفـة معينة عن غيرها فى اللون وحجم البروتوبلاسـت. فمثلا يمكـن تمييز الخلايا الهجينيـة الخالية من الكلوروفيل بسـهولة إذا كانت ناتجة مـن اندماج خلايا لا تحتوى على كلوروفيل أو تمييزها بوجود خيوط سـيتوبلازمية وكلوربلاست إذا اندمج سيتوبلازم خلية تحتوى على كلوروفيل وسيتوبلازم لايحتوى على كلوروفيل.

● **اسـتخدام جهـاز مميـز الخلايـا** Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)

ويسـمى أيضـا Continuous flow cytometer. وتعتمد هـذه الطريقة على تلوين بروتوبلاسـت خلايا النوعين المطلوب دمجهما كلٍ بلون خاص مختلف عن الآخر. وتستخدم صبغات وميضية Fluorescent dyes مختلفة (تسمى دلائل وميضية Fluoes-cence markers) مثل Fluorescein أو Rhodamine. وباستخدام جهاز مميز الخلايا

Cell Sorter يمكن تمييز وانتخاب وفصل الخلايا ذات النواة الهجينية ذات الألوان المختلفة وذلك بتمرير خلايا البروتوبلاست المندمجة وغير المندمجة فى جهاز مميز الخلايا حيث تمتص الخلايا الهجينية الطاقة الضوئية ثم تنبعث منها فى صورة وميض ضوئى مختلف.

- **الطرق الطبيعية للفصل** Separation on physical characteristics

حققت الطرق الطبيعية تقدما كبيرا فى تمييز الخلايا الهجينية. حيث تستخدم طريقة التمييز بين الشحنة الكهربائية المنتشرة على سطح الخلايا الهجينية ومقارنتها بالشحنة المنتشرة على بروتوبلاست الآباء. واختلاف تأثير الطرد المركزى على الخلايا الهجينية بالمقارنة بالآباء. وهى طرق يمكن أن تؤدى إلى نتائج جيدة فى حالة الكثافة العالية من الخلايا الهجينية فى البيئة الغذائية ولكن يجب عدم الاعتماد عليها بصورة مطلقة.

٨- مرحلة الانتخاب المعملى للطفرات من الهجن الجسمية

قد تحدث طفرات ذاتية فى الهجن الجسمية الناتجة من اندماج بروتوبلاست خليتين من خلايا الصنف النباتى النامى فى البيئة الغذائية أو تحدث فى هجن جسمية ناتجة من اندماج بروتوبلاست مستخلص من خليتين مختلفتين فى الصنف أو النوع أو الجنس أو العائلة. ويمكن استحداث طفرات فى الخلايا الجسمية المندمجة بتعريضها لبعض المطفرات مثل Ethylmethane sulphonate; N-ethyl N-nitro-ureum أو أشعة جاما أو أشعة إكس أو بنقل جينات أو إحداث تغيير فى تركيب الحمض النووى DNA. وعند انتخاب طفرات من الهجن الجسمية للبروتوبلاست يتم التركيز على الخلايا الهجينية ذات الصفات غير العادية. ويفضل الإبقاء على الخلايا غير المعاملة بالمطفرات للمقارنة مع الخلايا المعاملة مع الاهتمام بمتابعة كل خلية منتخبة بمفردها من حيث التكاثر والتكشف والنمو للحصول على سلالة خلوية Cell line.

طرق الانتخاب المعملى للطفرات

(أ) الانتخاب المباشر للطفرات

تنتخب الطفرات من المزارع المعملية للبروتوبلاست أو من معلق الخلايا التى تتميز بالقدرة على النمو تحت ظروف غير عادية من الإجهاد البيئى مثل الملوحة والجفاف والمضادات الحيوية والسموم النباتية Phytotoxins والعناصر الثقيلة وغيرها.

(ب) طـرق تحليلية لصفات الهجن الجسـمية Characterization of somatic hybrids

١- تحليل مشابه الإنزيم Isoenzyme analysis

يتم تحليل الآباء الداخلة فى التهجين وتحليل الهجين الناتج نفسـه باسـتخدام جهـاز الإلكتروفريزيـس حيث تظهر حزم مختلفة من البروتـين على الجيل ***Gel***. ويظهر للهجين تعبير جينى عن بعض الحزم مشـابها فى ذلك أحد الأبوين. وربما تظهر حزم إضافية مشـتقة من تركيبات جديدة ناتجة من وحدات إنزيمية فرعية.
ومن مشـابهات الإنزيم المستعملة كدلائل Glucose- 6- phosphate dehydrogenase; Phosphoglucose isomerase; Glutamine oxaloacetate transaminase; Esterase and shikimate dehydrogenase

٢- تحليل جزىء "دنا" بالنواة Nuclear DNA analysis

يسـتخلص الحمض النووى DNA من الكروموسـومات أو من الكلوروبلاسـت أو الميتوكوندريا ثم يجزأ إلى شـظايا Fragments باستخدام إنزيمات قطع Restriction enzymes. ثم ترقم إحدى الشـظايا بالفوسـفور المشـع (^{32}P) وتلصق بجزىء DNA آخر، فسـوف يظهر فى الهجن الناتجة طرز مختلفة لحزم هجينية Hybridization bands من DNA يمكن متابعتها باستخدام الأوتوراديوجرام Autoradiograms.

٣- النشـاط الإنـزيمى Enzyme activity

إذا استخدمت طفرتان تتميزان بخاصية نقص إنزيم Nitrate reductase deficient (NR-) خـاص باختزال النترات، أى إنهما لا يسـتطيعان الاسـتفادة من النترات كمصـدر للنيتروجين. فإن الهجن الناتجة منهما قـد تختلفان عن الآباء وتكون لها القدرة على الاستفادة من النترات كمصدر للنيتروجين لاحتوائها على إنزيم Nitrate reductase وفى هذه الحالة يمكن تقدير نشاط الإنزيم.

٤- المظهر الخارجى Morphology

قد يظهر على الهجن الجسـمية صفات ظاهرية محددة أو ظهور بعض الصبغات مثل الأنثوسـيانين Anthocyanin أو وجود شـعيرات على سطح الورقة. وقد تكون بعـض هذه الصفات موروثة مـن الأب أو الأم. وقد تظهر صفات جديدة فى الهجن غير موجودة أصلا فى الآباء مثل ظهور صبغة قرمزية اللون على السـطح الخارجى من درنات البطاطس الهجن وظهور لون أصفر أو أحمر فى لحم الدرنة.

٥- تحليل سيتولوجى Cytological analysis

يمكن تقدير تكامل الكروموسـومات للهجن الجسـمية بطريقة روتينية بواسـطة الضغط بشـدة على قمة الجذر واستخلاص الكروموسـومات من كلا الأبوين. وتبين التحاليل الهجن التى تملك التكامل المتوقع للكروموسومات القادمة من كلا الأبوين، كما يمكن تمييز الانقسامات الشاذة Aneuploidy.

٦- تحليل الصفات المرغوبة Analysis of desired characters

تقدر الصفات الزراعية المرغوبة مثل مقاومة الأمراض والصفات القياسـية المعروفة لدى مربى النباتات.

٩- مرحلة تكوين جدر جديدة للبروتوبلاست المندمج

تكويـــن الجـــدار الخلـــوى للبروتوبلاســـت المندمج مـــن المراحل الهامة فـــى زراعة البروتوبلاست. حيث يرتبط انقسام الخلية ونموها بتكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاست. وتبدأ مرحلة نشـــوء الجدار الخلوى الجديد بعد نقل البروتوبلاســـت إلى بيئة خالية من الإنزيمات المحللة للسليلوز. فبعد ١٦ ساعة من نقل بروتوبلاست التبغ فى بيئة غذائية يزداد تكوين لويفات ســـليولوزية على السطح الخارجى من البروتوبلاست. وبعد يومين تتكـــون جـــدر خلوية جديدة لحوالى٦٠- ٨٠٪ من البروتوبلاســـت. وبعد ثلاثة أيام من الزراعة تتكون جدر خلوية لجميع البروتوبلاست. وأثناء هذه المرحلة يستلزم المحافظة على الضغط الأسموزى للبروتوبلاســـت فى البيئة الغذائية عند الحد الأمثل- يتناســـب مـــع زراعة ونمو البروتوبلاســـت- حتـــى لا تحدث أى تغييرات غـــير مرغوبة فى بناء خليـــة البروتوبلاســـت. لذلك يجب أن يكون تركيز أيونات الكالســـيوم (Ca^{++}) مرتفعة والجهـــد الأسموزى الســـالب للبيئة منخفضا خلال إعادة تكويـــن الجدار الجديد حول البروتوبلاســـت، ثم يرفع الجهد الأسموزى للبيئة تدريجيا خلال الأيام القليلة من بدء تكوين الجدار الخلوى. ويحدث أول انقســـام للخلية الجديدة بعد ٢- ٧ أيام من زراعة البروتوبلاست. وتتحول الزراعة فى هذه المرحلة من زراعة بروتوبلاست إلى زراعة خلايا نباتية عادية. لذلك تحفز الخلايا الجديدة على الانقســـام والنمو والتكشـــف إلى أعضاء نباتية مختلفة حتى يتم تكوين النبات الكامل. وتســـتخدم مادة Calcaflour White ST بتركيز ٠,١٪ للكشـــف عن تكوين الجدار الخلوى الجديد. ويتميز هذا المركب بقدرته على انعكاس الضوء الســـاقط عليه من مصدر للضوء الأزرق. ويعامل البروتوبلاست بهذا المركب ســـواء كان فى بيئة ســـائلة أو صلبة. حيث توضع الخلايا المتكونة حديثا لمدة ٥دقائق مع مراعاة الحفاظ على الضغط الأسموزى وغسل الخلايا بعد ذلك لإزالة المتبقى مـــن هذه المادة. وتفحـــص تحت الضوء الأزرق. فالخلايا التـــى كونت جدارا يكون لها القـــدرة على انعكاس الضوء الأزرق. ويفى بهذا الغرض مصباح زئبقى يحتوى على فلتر إنارة BG 12 وفلتر مكثف K 510. ولوحظ أن البروتوبلاســـت المســـتخلص من الطبقة

الوسـطى لأوراق التبغ استعادت نشاطها وكونت جدارا خلوية بسرعة، وأن حوالى ٦٠-٨٠٪ من هذه الخلايا بدأت فى الانقسام بعـد ٤ أيام من زراعتها فى البيئة الغذائية. ويؤدى انقسام هذه الخلايا إلى تكوين كتل من الكالس. ويضاف لبن جوز الهند إلى البيئة الغذائيـة للحصول على انقسـام خلوى جيد والحصول على كتـل من الكالس، ويمكن تحفيز خلايا الكالس على النمو وتكوين أفرع والحصول على نباتات كاملة.

١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست المندمج

العوامل المؤثرة فى انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست

١- العوامل الوراثية

تنمو بعض أنواع البروتوبلاست بصورة جيدة على بيئة غذائية معينة دون غيرها من البيئات بالرغم من ثبات الظروف البيئية المحيطة، وقد يرجع ذلك إلى أسباب وراثية، حيث تختلف كفاءة انقسـام البروتوبلاسـت باختلاف الأنـواع التابعة للجنس بيتونيا Petunia، ويصعب انقسـام البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. paradii* بصرف النظر عن نوع البيئة المسـتخدمة، بينما البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. hybrida* أو من نباتـات الجيل الأول للهجين «*P. paradii x P. hybrida*» كان سـهل الانقسـام. كذلك يتأثر نمو البروتوبلاسـت بمسـتوى تضاعف العدد الكروموسومى بالخلية. فمثلا قابلية انقسام البروتوبلاست المستخلص من نباتات ثنائية كان مرتفعا بالمقارنة مع بروتوبلاست النباتات الأحادية. ويحتاج البروتوبلاست المستخلص من خلايا الطبقة الوسطى لأوراق نباتات أحادية إلى إضافة معقدات طبيعية إلىالبيئة لتشجيعه على الانقسام.

٢- نوع النبات

تختلـف كفاءة نمو خلايا البروتوبلاسـت فى البيئـة الغـذائية باختلاف الأنواع والأجناس النباتية. فقد نجح ٣٨ جنسـا نباتيا من بين ٦٦ جنسا فى إنتاج نباتات

من خلايا البروتوبلاست. وأن بروتوبلاست نبات الأرز هو الأسهل من بين الأجناس التابعة للعائلة النجيليـــة *Gramineae*. كذلك ينجح إكثار أجناس تابعة للعائلة *So-lanacea* مثل *Capsicum; Datura; Browallia; Lycopersicon; Solanum; Nicotiana; Atropa; Petunia; Hyocyamus* وأنـــواع نباتيـــة تابعة لعائـــلات نباتية مختلفة مثل *Daucus carrota; Medicago sativa; Brassica napus; Asparagus officinalis; Manihot esculenta; Trifolium repens; sinesis Citrus*. ولم تصـــل الأنـــواع التابعة للجنس *Nicotiana* إلى مســـتوى كفاءة النوع *Nicotiana tabacum* من حـيث قابليته للانقسام والنمو. وكان النوع *N. sylvestrris* أقل كفاءة فى الانقسام ونمو البروتوبلاست بالرغم من محاولات تحسين الظروف البيئية المحيطة وتغيير مكونات البيئة. ويعتبر القمح والشـــعير وغيرهما من محاصيل الحبوب بأنها ضعيفة فى إعطاء بروتوبلاســـت قادر على الانقســـام والنمو حتى ولو كان مســـتخلصا من الطبقة الوســـطى للورقة لصعوبة تكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاســـت وعدم القدرة على الانقســـام وصعوبة الحصول على كالس من أوراق هذه المحاصيل.

٣- البيئة الغذائية

أثناء فصل البروتوبلاســـت قد يحدث ضرر للشـــبكة البلازميدية مما يؤدى إلى تسرب بعض مكوناته من السوائل إلى البيئة الغذائية، لذلك تضاف بعض منظمات النمـــو ومـــواد أخرى إلى البيئـــة لتعويض ما تفقده. كما أن هـــز الدوارق المحتويه على بروتوبلاســـت بجهاز الرج قد يؤدى إلى تمزق الشـــبكة البلازميدية وتحطيم البروتوبلاســـت. لذلك يفضل أن يكون البروتوبلاســـت فى بيئة ســـائلة ساكنة أو متحركة ببطء للمحافظة على البلازميدات ومســـاعدة البروتوبلاســـت على الهبوط بســـلام إلى قاع الدورق. وثبت أن إضافة ٦ مللى بيئة سائلة حاملة للبروتوبلاست فـــوق بيئة مماثلة مضاف إليها آجار (بيئة ثنائيـــة المظهر Two-phases medium) فى طبق بترى قطر ٩سم أعطت نتائج جيدة. واستخدام الأطباق الزجاجية أفضل من البلاســـتيكية لتجنب التصاق البروتوبلاســـت على جدر الأطباق البلاستيكية.

ويفضل إضافة ٠,٠٤- ٠,٠٢٪ مادة ناشرة مثل Tween-80 لمنع الالتصاق. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح كبير فى زراعة البروتوبلاست. ومن فوائد هذه الطريقة إمكان استبدال البيئة السائلة (الطبقة العلوية فى الطبق البترى) ببيئة أخرى مماثلة لنفس البيئة السائلة ولكنها طازجة، ويمكن أيضا إحلال أجزاء من البيئة الصلبة (الطبقة السفلية فى الطبق البترى) بأجزاء من بيئة مماثلة صلبة طازجة وبنفس الحجم. ويتم هذا الاستبدال فى البيئة السائلة والصلبة باستمرار للمحافظة على الضغط الأسموزى وتحفيز الخلايا على النمو والانقسام بصورة منتظمة. وبهذه الطريقة تنشأ تجمعات من خلايا البروتوبلاست وتهبط على طبقة البيئة الصلبة فى قاع الطبق وتنمو بنجاح، ويمكن متابعتها ونقلها فيما بعد للإكثار. وتستخدم بنجاح البيئات الجاهزة التى لها نفس مواصفات بيئة (MS) لزراعة البروتوبلاست. وثبت أن إضافة كلوريد الكالسيوم بتركيز ٥ ملليمولر وكبريتات الماغنسيوم بتركيز ٤ ملليمولر للبيئة كان لها القدرة على الحفاظ على الأغشية البلازمية والحصول على نتائج جيدة فى زراعة البروتوبلاست المفصول من خلايا الطبقة الوسطى للأوراق.

ويمكن زراعة البروتوبلاست فى بيئة سائلة أو صلبة، بالرغم من أن لكل منهما بعض المشاكل. ويفضل أن تحتوى البيئة الصلبة على ٠,٢٪ آجار بدلا من ٠,٦٪، ويفضل النوع Baker Agar بدلا من Difco Agar وإضافة الكازين Casein hydro-lysate أو بعض الأحماض الأمينية مثل الجلوتامين إلى البيئة تعطى نتائج جيدة. ويعتبر السكروز هو المفضل دائما كمصدر للطاقة والكربون، وإضافة الجلوكوز أو الزايلوز Xylose والرايبوز Ribose مجتمعة أو منفردة إلى البيئة تعطى نتائج مفيدة. وإضافة الأكسينات (2,4- D; NAA) والسيتوكاينينات(BAP ; KIN) منفردة أو مجتمعة بتركيز ٠,١- ٥ ملليجرام/ لتر إلى البيئة لها أهمية كبيرة جدا لاستمرار نمو خلايا البروتوبلاست وتحقيق إنتظام وجودة النمو. ويختلف تركيز منظمات النمو فى البيئة باختلاف البروتوبلاست ومصدره. أما بالنسبة للمواد الحافظة على

الضغط الأسموزى فتستخدم نفس المواد المستخدمة فى مرحلة فصل البروتوبلاست. ويعتبر المانيتول بتركيز ٠,٥– ٠,٦ مولر أكثرها استخداما. ويستخدم كذلك خليط المانيتول + السربيتول بنجاح أيضا. كما يستخدم سكر الجلوكوز مع بروتوبلاست خلايا نبات الفول البلدى وفول الصويا. بينما كان السكروز مفضلا لنمو بروتوبلاست نبات Brome grass.

٤- الظروف البيئية المحيطة

تختلف أنواع البروتوبلاست فى احتياجها للحرارة أثناء التحضين، لذلك يجب تحديد درجة الحرارة المناسبة حتى لا تكون سببا رئيسيا فى تثبيط نمو البروتوبلاست. فمثلا يحضن بروتوبلاست نبات التبغ عند ١٦– ٣٧°م وبروتوبلاست نبات الطماطم عند ٢٩°م لكى يحقق كفاءة عالية فى النمو والانقسام. وللضوء تأثير كبير فى إنجاح البروتوبلاست خاصة إذا كان مصدره الطبقة الوسطى للأوراق. وتعتبر أفضل شدة إضاءة لبروتوبلاست نبات التبغ هى ٣٣٠٠ لكس، وانخفاض شدة الضوء يؤدى إلى انخفاض قدرة البروتوبلاست على النمو.

٥- كثافة البروتوبلاست فى البيئة الغذائية

كثافة خلايا البروتوبلاست فى البيئة السائلة لها أهمية كبيرة فى طبيعة نموها. وتشير الدلائل إلى إمكانية نمو بعض أنواع البروتوبلاست عند كثافة منخفضة جدا تصل إلى ١٠٠٠ بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة. ويفشل بروتوبلاست نبات التبغ فى الانقسام والنمو إذا كانت كثافته أعلى من ٥ × ١٠^{٥} بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة. وأن الكثافة المثلى التى أعطت أفضل معدل للانقسام والنمو هى ٥ × ١٠^{٤} بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة، ولم يلاحظ أى انقسام عندما كانت كثافة البروتوبلاست ٦ × ١٠^{٢} بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة أو أقل من ذلك. ومن ناحية أخرى وجد أن أفضل كثافة لبروتوبلاست خلايا نبات البيتونيا Petunia هى ٣,٥ × ١٠^{٤}/ ملليلتر.

أهم الممارسات الوراثية للبروتوبلاست المندمج

١- التهجين الجسمى بين أنواع مختلفة Somatic hybridization

يعرف التهجين الجسمى أيضا باسم Para-sexual hybridization. فى الواقع أن دمج البروتوبلاست ليس له ميزة خاصة لإنتاج هجن جسمية فى حالة إذا كان من السهل إنجاز التهجين بالطرق التقليدية. ودمج البروتوبلاست له أهمية كبيرة فى إنتاج خلايا هجينية لبعض المحاصيل التى يصعب تهجينها بالطرق التقليدية لأسباب عدة مثل عدم وجود قرابة أو عدم توافق أو وجود عقم ذكرى أو مسببات أخرى. فإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست من نفس النوع النباتى تتكون نواة متجانسة Homokaryon. وإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست واندمجت نواتاهما وهما مختلفان فى الجنس أو النوع تتكون نواة غير متجانسة Heterokaryon. وفى كلتا الحالتين تندمج النواتان بعد اندماج البروتوبلاست ثم يتكون جدار خلوى حول البروتوبلاست لتتكون خلية جديدة، وبزراعة خلية البروتوبلاست على بيئة غذائية وظروف بيئية مناسبة تنقسم ويتكون منها نبات كامل. وبالرغم من صعوبة التهجين فى الحقل بالطرق التقليدية بين نوعين من البطاطس أحدهما *S. tuberosum* (يكون درنات وغير مقاوم أو قليل المقاومة للأمراض) والثانى *S. brevidens* (لا يكون درنات ومقاوم للأمراض)، فقد نجح التهجين بينهما بدمج البروتوبلاست والحصول على نباتات كاملة من الخلية الهجينية. كذلك تم إنتاج هجينين أحدهما تابع للجنس *Brassica* وهو « *Brassica oleracea x B. compestris* » والآخر تابع للجنس *Medicago* وهو «*Medicago sativa x M. falcate*» بدمج البروتوبلاست وكان هناك صعوبة فى إنتاج الهجينين بالطرقة التقليدية. وتم الحصول أيضا على الهجين «*Nicotiana langsdorffii x N. glauca*» بدمج البروتوبلاست. وثبت أن الحالات التى ينجح فيها التهجين بين جنسين وإنتاج بذور منهما بالطرق التقليدية هما أيضا قادران على إنتاج هجن بطريقة الدمج بين البروتوبلاست. لذلك يجب اختيار مستعمرات

من البروتوبلاســت نجح فيها الاندماج وتكويــن هجن على أن يتوفر التوافق بينهما وتندمج جميع محتويات النواتين فى نواة هجينية. لأن كثيرا ما يؤدى الإندماج بين البروتوبلاست إلى فشل الأنوية فى الإندماج أو فقد بعض الكروموسومات نتيجة لعدم قدرتها على الحركة السـريعة واللحاق بمرحلة التناسـخ Replication، وبناء على ذلــك يمكن أن تفقد أعدادا كبيرة من الخلايا نتيجة بطئها الشــديد فى النمو وعدم قدرتها على الانقســام. وبعد إتمام اندماج البروتوبلاســت تظهر صعوبة فى انتخاب الهجن الجســمية Somatic hybrids من مجموعة الخلايا الموجودة. فمثلا إذا حدث تهجين بين بروتوبلاســت خليتين مختلفتى المصدر (A) و(B) فإن عشــيرة الخلايا الهجينية الناتجة قد تحتوى بعضها على بروتوبلاست غير مندمج من (A) ومن (B) بجانب بروتوبلاست مندمج مكونا هجينا ذات نواة متجانسة (AA) Homokaryons و(BB). وقد تندمج النواتان مكونة نواة هجينية غير متجانسة Heterokaryons (AB) بجانــب أنواع مختلفة متعددة الأنوية ومندمجة. وقد حدث تطور فى طرق انتخاب الهجين المرغوب (AB). ونجح التهجين الجسمى بين أنواع نباتية كثيرة مثل:

Brassica campestris; B. oleraceae; B. napus; Medicago sativa; Petunia spp.; Lycopersicon lycopersicum; Solanum tuberosum; Daucus carota; Nicotiana species; Pennisetum americanum; Trifolium repens.

كذلك نجح التهجين الجسمى بين أجناس نباتية مختلفة مثل:

"Solanum tuberosum x Lycopersicon lycopersicum"
"Brassica x Arabidopsis"
"Daucus carota x Acgopodium podagraria"

٢- إنتاج هجن سيتوبلازمية Cytoplasmic hybrids (Cybrids)

هــى طريقة مازالــت فى مراحلها الأولى لانخفاض نســبة نجاحهــا. حيث يتم التهجين بدمج بروتوبلاســت (نواة + سيتوبلازم) لنبات (A) مع سيتوبلازم فقط من نبات (B). وقد نجحت هذه الطريقة فى إنتاج هجين سيتوبلازمى *"N. plumbaginifolia x Nicotiana tabacum"* وهــذا النــوع من التهجين هام فى حالة وجود ظاهرة

عقــم ذكرى ســيتوبلازمى Cytoplasmic male sterility تتحكم فيه جينات محمولة على الميتوكوندريا أو مقاومة بعض الأمراض أو مقاومة لبعض مبيدات الحشائش.

٣- زراعة الأنوية Transplantation of nuclei

تنحصــر فى امتصاص نواة خلية ثم زراعتها فى خلية أخرى. أو فصل قطعة من الحمــض النووى DNA عليها جين خــاص بصفة محددة مثل مقاومة مرض معين، ثم إدخالها على جينوم نبات آخر. وتســمى هذه الطريقة بتهجين الحمض النووى. كذلك تشــمل هذه الفكرة على فصل جســيمات مثل البلاستيدات والميتوكوندريا من ســيتوبلازم خلية ما ونقلها إلى سيتوبلازم خلية أخرى. وهذه طريقة واعدة من طرق الهندسة الوراثية.

٤- إنتاج نباتات ثنائية ورباعية

يتــم ذلك بدمج بروتوبلاســت خليتين ثنائية العدد الكروموســومى لإنتاج خلية رباعية Tetraploid. أو دمج بروتوبلاســت خليتــين أحاديتين Haploids للحصول علــى نباتات ثنائيــة Diploids، ثم معاملة النباتات الثنائية بالكولشســين لإنتاج نباتات رباعية.

٥- التحور الوراثى Transformation

قد يؤدى دمج البروتوبلاســت إلى تكامل جينــى وظهور صفة فى الهجين الناتج غــير موجودة فــى الآباء مثل ظفرتين من نبات التبــغ *Nicotiana tabacum*- الأولى حساســة للضوء (SS vv) والثانية أقل حساســية (ss VV)- والتهجين بينهما أنتج هجينا (SSss VVvv) غير حســاس للضوء وهى صفة غــير متوفرة فى الآباء. كذلك وجد أن كلا من نباتى *Nicotiana glauca* و*B. langsdorfi* يحتاج إلى إضافة أكســين النمو إلى البيئة الغذائية، وبدمج البروتوبلاســت بينهما أنتج هجينا يتميز بالاكتفاء الذاتى من الأكسين المنتج طبيعيا فى خلاياه.

سلبيات التهجين الجسمى Disadvantages of somatic hybridization

لاحـــظ (Sneep, et al., 1982; Harms, 1983) وجــود بعض الســلبيات للتهجين الجسمى منها:

١- لا توجـد طريقــة ذات كفاءة عاليــة للانتخاب. والمنتــج النهائى للتهجين الجســمى غالبا يكون عقيما أو متغيرا فى صفاتــه الخارجية أو غير ثابت وراثيا أو ميتا خصوصا فى حالة اندماج سيتوبلازم لأبوين غير متقاربين.

٢- نمــو كايميرا بالكالــس Chimeric calluses فى موقع الخلية الهجين نتيجة لعدم اندماج نواتى الخليتين بالرغم من اندماج البروتوبلاست.

٣- يؤدى التهجين الجســمى بين خليتين ثنائية العدد الكروموسومى إلى تكوين خلايا ملتصقة Amphidiploid وليست مندمجة، وهى ظاهرة غير مستحبة.

٤- يظهــر فى الأجيال التالية للتهجين الجســمى بين أنواع متباعدة فى المملكة النباتية بعض الشذوذ مثل غياب كروموسوم أو حدوث انقسامات شاذة Aneuploids أو غياب نواة من السيتوبلازم Cybrids.

إنتاج بروتوبلاست أحادى Haploid Protoplast

يتشــابه بروتوبلاســت خلايا طبقة الميزوفيــل المفصول من نباتــات أحادية مع برتوبلاســت النباتات الثنائية من حيث الانقسام فى البيئة الغذائية وإعطاء نباتات قــادرة على التكاثر. كذلك يمكن فصل البروتوبلاســـت من جميــع أجزاء النبات تقريبــا، وأصبح الآن من الأعمال الروتينية بصرف النظر عن إن كان مصدره نباتات أحادية أو متضاعفة العدد الكروموســومى. وقد تميل خلايا البروتوبلاست الأحادى إلى التضاعــف الكروموســومى بعد زراعتها فى المعمل، ولكــن النباتات الناتجة من بروتوبلاســت التبغ والبيتونيا والبطاطــس والأتروبا والداتورا تحتفظ بثباتها الوراثى وتظل أحادية العدد الكروموسومى. وقد ثبت أن زراعة بروتوبلاست خلايا الميزوفيل هى طريقة واعدة لإكثار النباتات الأحادية.

١- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح ناضجة

فى النباتات المزهرة Angiosperms، القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة مغطاة بمادة Sporopollenin، معقد من بوليميرات كاروتينية وإســتر كاروتينات فى سلســلة مســتقيمة غير متفرعة من مركب β–1,3 Glucan. وهى مــن أكثر المركبات العضوية صلابة ومقاومة لفعل المذيبات. ويمكن إذابتها فقط فى ايدروكسيد بوتاسيوم KOH ومحاليل مؤكســدة قوية وبعــض القواعد العضوية الخاصــة وبعض الكائنات الدقيقــة، ولكن لم يثبــت إمكان هضمها بالإنزيمات. ويتم فصل البروتوبلاســت من حبــوب لقاح ناضجة بإضعاف ثقب حبة اللقــاح Germpore وإحداث تحلل جزئى للقشــرة الخارجية Exine لحبة اللقاح وإزالة القشرة بعد ذلك ميكانيكيا. ويستخلص البروتوبلاست الأولى Subpro-toplasts من أنبوبة حبة لقاح نابتة. ويتميز البروتوبلاست المفصول حديثا بشكله الكروى Spherical واحتوائه على فجوة Vacuole. فإذا عرضت عشــيرة من البروتوبلاســت للطرد المركزى يندمج بطريقة ذاتية ويكون بروتوبلاست عملاقــا متعدد الأنويــة Multinucleate giant protoplasts. وبزراعة البروتوبلاســت معمليا يحدث له استطالة ثم انقسام وتكوين براعم قادرة على النمو (Bajaj, 1975).

٢- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح غير ناضجة

نظــرا لصعوبــة فصل البروتوبلاســت من حبــوب اللقاح الناضجــة فإنه يفضل اســتخلاصه من خلايــا أمية لحبوب اللقــاح Pollen mother cells وهى فى مرحلة مبكــرة مــن النمو ويفضل أن تكون فى مرحلة الانقســام الرباعــى Pollen tetrads، حيث تكون مغلفة بجدار بسيط غير معقد مثل القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة. وخطوات فصل وزراعة البروتوبلاست من خلايا أمية لحبوب اللقاح وهى فى الطور الرباعى Tetrad قد حددها كالآتى:

١- يفصــل متــك واحد تحت ظــروف معقمة من برعم زهــرى حديث ثم يصبغ بصبغة Aceto-carmine للتأكد من مرحلة نمو حبوب اللقاح.

٢- تقطع نهاية قاعدة المتك بواسطة مشرط مدبب الطرف. ثم يضغط على المتك ضغطا خفيفا لإفراز محتواه إلى الخارج باستخدام ملعقة زجاجية Spatula. مع مراعاة أن الضغط الشديد نسبيا يؤدى إلى إخراج الخلايا ثنائية العدد الكروموسومى Diploid من المتك فى صورة شريطية Tapetal cells. وتظهر محتوى الخلايا الأمية لحبوب اللقاح والخلايا الرباعية Tetrads فى صورة محلول لبنى.

٣- يعامل البروتوبلاست المستخلص بخليط من إنزيم هليكيز Helicase تركيز ٠,٧٥- ١٪ مضافا إليه ٨- ١٠٪ سكروز (إنزيم هليكيز مستخلص من أمعاء قواقع Snail intestines)، وتحضن لمدة ٣٠- ٤٥ دقيقة. ويستخدم خليط الإنزيم بمعدل واحد ملليلتر لكل متك واحد فقط.

٤- بعد التحضين يتم إحلال خليط الأنزيم بمحلول ١٠٪ سكروز ويترك حتى يستقر البروتوبلاست.

٥- يشطف البروتوبلاست عدة مرات ببيئة سائلة طازجة، ثم يضاف البروتوبلاست إلى بيئة سائلة، ثم يزرع فى المعمل، فتتكون جدر لبعض البروتوبلاست وتظهر عليه براعم. وقد يحدث انقسام أحيانا. وعادة تكون كمية البروتوبلاست المستخلص قليلة. لذلك لا يفضل إجراء الطرد المركزى حتى لا تنخفض كميته. وتلقى زراعة بروتوبلاست حبوب اللقاح قبولا فاترا لقلة ما ينتجه من نباتات أحادية.

□□□

الباب التاسع

المركبات الأيضية الثانوية فى النبات

أهمية المركبات الثانوية Secondary metabolites

هــى مركبات ثانوية By-products تنتج فى النبــات أثناء تمثيل المركبات الأيضية الأساسية التى لها أهميتها لنمو وتطور النبات مثل البروتينات والكربوهيدرات والدهون وغيرهــا . ومعظــم المركبات الثانوية قــد لا يكون لها أهمية فى نمــو النبات وتطوره. وهى مركبات بســيطة أو متعددة ومختلفة فى تركيبهــا الكيميائى فمنها زيوت طيارة Volatile oil وقلويــدات Alkaloids وتربينــات Terpenoids وإســترويدات Steroids وأنثوســيانينات Anthocyanins وأنثراكوينونات Anthraquinones وفلافونات Flava- noids وجليكوزيــدات Glycosides وفينــولات Phenols ومركبات أليفاتية Aliphatic ومركبــات أخرى كثيرة. وهذه المركبات محدودة الانتشــار بين الأنــواع النباتية. فقد يحتوى نوع أو جنس نباتى دون غيره على مركب محدد أو عدة مركبات تكسبه صفة التميــز علــى غيره من النباتات. وقد ينحصر تواجد هذه المركبات فى عضو أو نســيج معين دون غيره مثل الورقة والزهرة والثمرة والقلف والبذرة وغيرها. وقد يظهر تركيزها فــى مرحلة معينة من النمو. والمركبات الثانوية فى النبات لها أهمية كبيرة للإنســان فى المجالات الطبية والصناعية مثل صناعة الأدوية Drugs ومكســبات الطعم Flavors والعطــور Perfumes والصبغات Pigments وغيرها. وهذه المركبات غالبا ثابتة التركيب لا تتغــير ويصعب بناؤها داخل المعمــل. وأهميتها للنبات غير معروفة حتى الآن. وقد تكــون بعض هذه المركبات ســامة وحاميــة للنبات ضد أعدائه الحيوية. ويســتخلص الإنســان هذه المركبات لمقاومة الآفات. وتســتخدم زراعة الأنســجة لاستخلاص كثير من المنتجات الثانوية من الأنســجة أو الأعضاء النباتية المنتجة والخازنة لها مباشــرة Endogenous. وتــزرع الخلايــا معلقة فى بيئة ســائلة فى مخمــرات كبيرة لاكثارها.

وتستخلص المركبات الثانوية على نطاق تجارى مباشرة من البيئة السائلة وتسمى Exogenous. ومنذ خمسينات القرن العشرين حدث تطور كبير فى إنتاج المخمرات والمعدات لاستخلاص المنتجات الثانوية من المزارع المعملية بكفاءة عالية جدا. وتستخدم هذه الأجهزة فى استخلاص العديد من المنتجات الطبية مثل استخلاص حمض Chlorogenic من نبات *Haplopappus* والفينولات Phenolics من نبات *Acer* والسربنتين Serpentine من نبات *Catharanthus* والنيكوتين Nicotine من نبات *Nicotiana*.

مكسبات الطعم

١- المجموعة الأولى

هى مجموعة من مكسبات الطعم موجودة بصورتها النهائية فى خلايا النبات Endogenous ومنها:

(أ) مكسبات طعم بسيطة Simple flavours

مركبات كيميائية ترتبط بها مجموعة واحدة صغيرة تكسبها صفة مميزة مكسبة للطعم مثل الكابسيسين Capsaicin فى الفلفل Capsicum وGingerols فى الزنجبيل Zingiber.

ب- مكسبات طعم معقدة Complex flavours

مركبات مختلفة فى تركيبها ورتبتها الكيميائية. فقد تكون زيوتا عطرية طيارة أو مركبات ثابتة تنتشر فى ثمار الفاكهة والخضر. وتشترك المركبات الموجودة فى ثمرة معينة فى إظهار الطعم والرائحة المميز لها (Van Straten, 1977).

٢- المجموعة الثانية

مركبات كيميائية ليست مكسبة للطعم، توجد فى خلايا النبات فى صورة بوادىء Precursors، تتحول إلى مركبات مكسبة للطعم أثناء المضغ أو التقطيع مثل

الثوم والبصل والكرنب حيث تتكون مركبات مكسبة للطعم نتيجة النشاط الإنزيمى على البوادىء الموجودة فى خلايا الثمرة. ففى البصل مثلا توجد مركبات S-methyl ; S-propyl ; S-trans-prop-1-enyl-L-cysteine sulphoxide مشتقة Derivatives من مركبات أخرى. وتعتبر بوادىء رئيسية غير طيارة. وخلال تمزق الخلية تتعرض هذه البوادىء لنشاط إنزيم Alliinase الذى يؤدى إلى إنتاج بوادىء سلفوأكسيد Sulphoxide precursors، وهذه بدورها تتحلل إنزيميا لتكون حمض سلفينيك Sul-phenic acid مع الأمونيا Ammonia ومركب Pyruvate. ويدخل حمض السلفينيك فى سلسلة من التفاعلات الكيميائية ينتج عنها مركبات عديدة متطايرة تحتوى على الكبريت ومكسبة للطعم. كذلك توجد منتجات ثانوية أخرى مكسبة للطعم مشتقة من مركبات داخل الخلية غير مكسبة للطعم. ويمكن الحصول عليها أثناء عملية التخمر Fermentation أو عمليات أخرى، ومن أمثلة ذلك المركبات المكسبة لطعم الكاكاو Cocoa والفانيليا Vanilla التى تظهر أثناء معالجة Curing الثمار والطعم المميز للبن Coffee الذى يظهر أثناء التحميص.

نظم إنتاج المركبات الأيضية فى المعمل

١-نظم الخلايا غير المتحركة Immobilized cell systems

وفيه تطمر الخلايا Embedded cells أو تصيد الخلايا Entrapped cells فى مادة جيلاتينية Gel أو فوم Foam، وتبقى ساكنة الحركة Immobilized وهى فى بيئة غذائية سائلة. وعند وصول الخلايا إلى ما بعد مرحلة أو مرحلتين من مراحل الثبات Stationary phase تستخلص المركبات الثانوية منها. والهدف من هذا النظام هو إنتاج مستمر أو نصف مستمر للمركبات الثانوية طبيعيا واستخلاصها بسهولة. ومن أمثلة ذلك استخلاص مادة الشيكونين Shikonin الحمراء تجاريا من نبات *Litho-spermum erythrorhizon*. حيث تزرع خلايا النبات فى مخمر كبير Fermentor يحتوى على بيئة غذائية خاصة بزراعة وإكثار (Propagation medium) الخلايا

بكمية كبيرة. ثم تنقل الخلايا إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة جديدة تسمى بيئة إنتاج (Production medium). وثبت نجاح هذه الطريقة فى إنتاج مادة الكابسيسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutescens*، ومادة الأنثراكوينون Anthraquinones من نبات *Morinda citrifolia*، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا *Datura innoxia*.

٢- نظم التحولات البيولوجية Biotransformation System

استخدمت زراعة الأنسجة لإنتاج مركبات أيضية ثانوية فى الخمسينات من القرن العشرين. وتتميز هذه الطريقة بإنتاج مركبات تحت ظروف معملية منضبطة ومعقمة بنظام التحولات البيولوجية، حيث يضاف إلى البيئة الغذائية واحد أو أكثر من البوادئ الكيميائية، فيتم تحويله إلى منتج جديد أكثر قيمة، ويستلزم لذلك توفير بعض الإنزيمات بجانب المكونات الأساسية البسيطة للبيئة الغذائية مثل السكروز والعناصر الغذائية لتمثيل منتج أكثر تعقيدا. وقد يستلزم إضافة أو استبعاد أحد المجموعات الكيميائية من أحد المركبات من خلال عمليات حيوية مثل Hydroxylation وGlycosylation وAcetylation وMethylation ومن أمثلة ذلك:

- استخلاص مركب Digitoxin من خلايا نبات الديجيتاليس (Foxyglove) *Digitalis lantana* المنزرعة فى بيئة سائلة. ثم تحويل مركب Digitoxin إلى مركب Digoxin المستخدم فى علاج أمراض القلب. وتتم هذه العملية بإضافة مجموعة هيدروكسيل لذرة الكربون رقم ١٢ وتسمى بعملية Hydroxylation.
- إنتاج قلويدات Alkaloids مثل مركب Scopolamine بزراعة خلايا نباتات *Hyoscyamus niger; Atropa beklladonna*.
- إنتاج مركبات Anthocyanins من خلايا نباتات الجزر *Daucus carota* *Catharanthus roscus*.

– إنتاج مركب Anthraquinones من نبات *Morinda citrifolia*.

– إنتاج صبغة الشيكونين الحمراء Red pigment shikonin من نبات *Lithosper-mum erythrorhizon*.

– إنتاج مادة الكابسيسين Capsaicin من خلايا ثمار الفلفل *Capsicum frutes-cens*.

– إنتاج مركب Tropan alkaloids من خلايا نبات الداتورا *Datura innoxia*.

– إنتاج مركب النيكوتين المستخدم كمبيد حشرى من خلايا التبغ.

– إنتاج الفانيليا Vanillin من خلايا نبات الفانيليا بدلا من استخلاصها مباشرة من الثمار.

مواصفات الخلايا النباتية المستخدمة فى إنتاج مركبات ثانوية

– تتميز بوجود تعبير جينى متجانس Homogenous ثابت وراثيا يؤدى إلى إنتاج مرتفع.

– تتميز الخلايا بسرعة النمو والانقسام والنضج لأن فى ذلك زيادة إنتاج المركبات الثانوية.

– الخبرة المتميزة للباحث فى فصل وانتخاب الخلايا أو النسيج المنتج للمركبات الثانوية بدقة وتغيير اتجاه دورة التفاعل فى الوقت المناسب .

– الخبرة المتميزة للباحث فى تحديد موعد جمع المركبات الأيضية الثانوية، حيث إنه مرتبط بمرحلة ما بعد الانقسام Post-division phase أثناء دورة نمو الخلايا فى المعمل.

استخلاص بعض مكسبات الطعم فى المعمل

مازالت المعلومات المتوفرة حتى الآن عن مسار التفاعلات الكيميائية التى تؤدى إلى بناء كثير من المركبات الثانوية فى النبات محدودة. وهذا مؤكد بالنسبة

لمسار التفاعلات الخاصة بالمركبات الوسطية التى تؤدى إلى تكوين مكسبات الطعم، خصوصا إذا كانت تنتج فى خلايا أو عضو نباتى محدد من خلال تتابعات لبناء حيوى معبر عنه وراثيا، وهذا التعبير الوراثى مرتبط بفترة زمنية من السنة أو مرتبط بمرحلة معينة من نمو النبات. لذلك فمن المهم استخدام وسائل الهندسة الوراثية لنقل الجينات بهدف زيادة إنتاج مركبات اقتصادية محددة وخفض أو منع تكوين مركبات أخرى غير مرغوبة. ويجب أن تتميز الأجهزة الخاصة بزراعة الأنسجة بالكفاءة الذاتية لقياس سرعة نمو الخلايا والتحكم فى سرعتها وإنتاج مركبات مستهدفة. كما يجب أن تكون الأجهزة مزودة بوسائل إيقاف التمثيل البنائى فى الوقت المناسب وإجراء التجارب فى أية فترة من السنة وتحقق معدلا عاليا من الإنتاج. وتعتبر هذه النوعية من النظم وسائل جيدة لاستخلاص الإنزيمات والتعرف على المسار الكامل لتمثيل بعض المواد مثل مادة Berberine الموجودة فى نبات Berberis ونبات Coptis. وأجريت دراسات عديدة على أنواع مختلفة من مزارع الأنسجة النباتية والكالس ومعلق الخلايا ومزارع الخلايا غير المتحركة لإنتاج مركبات مكسبة للطعم (Hong and Harlander, 1989). ومن أمثلة ذلك:

١- الكابسيسين Capsaicin

يستخرج الكابسيسين من ثمار الفلفل التابعة للنوع *Capsicum frutescens* ويعرف تجاريا بالشطة الأفريقى African chilies وثمار النوع *Capsicum annum* ويعرف تجاريا بفلفل تاباسكو Tabasco. وتعرف هذه الشطة بأسماء تجارية أخرى مثل الشطة السودانى أو شطيطة أو فلفل أحمر. وتعتبر أمريكا الوسطى وأمريكا الجنوبية هى الموطن الأصلى لنبات الشطة. وتزرع بنجاح فى الوطن العربى وخاصة السودان والثمار هى قرون صغيرة خضراء اللون فى المرحلة الأولى من نموها ثم تتلون باللون الأحمر عند نضجها، وطعمها حريف جدا. والثمار الناضجة الحمراء الجافة هى المستعملة طبيا. وتحتوى ثمار الشطة على قلويد الكابسيسين Capsaicin بنسبة

٠,٠٢٪ وهى المادة الحريفة الرئيسـية فى ثمار الفلفل. وكان إنتاج مادة الكابسيسين منخفضـا قبل تواجـد المخمر الحيـوى Biofermentor الذى كان سـببا فى ارتفاع نسـبة الاستخلاص إلى١٠٠٪. وسـاعد على ذلك انتخاب سلالات من الفلفل تتميز بارتفاع محتواها من الكابسيسين، واستخدام نظام معلق خلايا غير متحركة، وتوفير الظروف البيئية المحيطة المناسـبة للاسـتخلاص. وتوضع الخلايا فى كيس شبكى من حبيبات بولى يوريثان فوم Reticulated Polyurethane Particles Foam. وبإضافة مركب Isocarpic acid– أحد البوادىء Precursors المنتجة للكابسيسين مباشرة– إلى البيئة الغذائية السـائلة تم الحصول على مزيد من الإنتاج. وكان أعلى معدل إنتاج هـو ٠,٥ ملليجرام Capsaisin/ جرام مـادة جافة/ يوم. كما زاد إنتاجية هذه المزارع باسـتخدام مراقد غير متحركة لخلايا الفلفل مصنوعة من جسيمات فوم ورقية Sta-tionary foam particles.

٢- الفانيلين Vanillin

نبـات الفانيليـا *Vanilla planifolia* معروفـة بالفانيليا المكسـيكى Mexican vanilla. وهـى من نباتات المناطق الحارة. ويسـمى فى المكسـيك وجاميكا بالخروب العطـرى. وتزرع الفانيليـا للحصول على ثماره. وهى قرون رفيعة اسـطوانية. طول القـرن حوالى٢٠ سـم. القرون الخضراء يتحول لونها عنـد النضج إلى الأصفر، وبعد معالجتهـا Curing صناعيا تتحـول إلى البنى القاتم. وتبـدأ المعالجة بجمع القرون الخضـراء مكتملة النمو وقبل اكتمال نضجها. ثم تجفف لتتكون بها مادة الفانيلين. وتحتـوى القرون الخضراء على مواد جلوكوزيدية أهمها جلوكوفانيلين Glucovanillin المعرفة باسـم أفينين Avenein وكحول Glucovanillic alcohol. وأثناء المعالجة يتحلـل الجلوكوفانيلين بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز ومادة الفانيلين. ويتحلل Glucovanillic بفعل الإنزيمات إلى جلوكوز وكحول الفانيليك Vanillic، ويتحلل كحول الفانيليك بعد ذلك إلى مادة الفانيلين.

ومعالجـــة قرون الفانيليا خطوة هامة لاكتمال تكوين مادة الفانيلين Vanillin فيها وإعدادها للتسويق. وتختلف طرق المعالجة باختلاف منطقة زراعة الفانيليا. وتجرى المعالجة بإحدى الطرق الآتية:

١- تعرض الثمار للشـــمس حتى تجف، ثم تحفظ بعد تجفيفها بين طبقات من البطاطين الصوف، ثم تعرض للشـــمس عدة أيـــام حتى يتم معالجتها واكتمال لونها وتكوين مادة الفانيلين.

٢- تعـــرض الثمار لغـــاز الإيثلـــين Ethylene في حجرات خاصـــة لفترة زمنية لمعالجتها وتكوين مادة الفانيلين.

٣- تغمس القرون لعدة ثوانٍ فى ماء مغلى، وتكرر ٢- ٣ مرات، ثم تجفف فى أفـــران ثم تحفظ بين طبقات من بطاطين صوف داخـــل حجرات حتى تتم المعالجة وتكوين مادة الفانيليا. وهذه طريقة تعطى نتائج أفضل.

استخلاص مادة الفانيلين Vanillin

مادة الفانيلين المكســـبة للطعم هى بللورات بيضاء لها رائحة وطعم قرون الفانيليا الجافـــة. وتخلق هذه المـــادة فى خلايا القرن من بـــوادىء جلوكوزيدية Glycosidic precursors فـــى وجود إنزيـــم B- glycosidase أثناء عملية المعالجة. وبالرغم من أن مركب الفانيلين Vanillin هو المكون الأساســـى لمـــادة الفانيليا، إلا أن عملية التخمر تـــؤدى إلى إنتاج مركبات أخرى تتواجد بتركيزات مختلفة وتتميز بتفوقها العالى فى طعـــم ورائحة الفانيليا Vanilla الطبيعى نفســـه. وقد أدخلت تحســـينات فى مزارع معلق خلايا نبات الفانيليا للحصول على أعلى إنتاج لها وهو ٣٨٣ ميكروجرام/ لتر/ يـــوم، ويظهر المركب المنتج فى معلق الخلايا فى صورة فينول حر أكثر من أن يكون Glycoside. كذلك أدخل تطور آخر حيث أضيف للبيئة الغذائية الخاصة بأنســـجة نبات الفانيليا بادىء يســـمى Ferulic acid يشـــجع إنتاج مـــادة الفانيلين. وأثبتت التجارب الســـابقة فى عدم تجمع مركبات فينولية مكســـبة للطعم فى مزارع الخلايا

المعلقة لنبات الفانيليا مالم تظهر مع مركب Chitosan الذى يعمل على تجمع حمض الفانيليك Vanilic acid أكثر من الفانيلين Vanilin. وقد ثبت أن مركب Isoferulic acid هو البادىء لحمض الفانيليك Vanillic acid. ونظرا لارتفاع سعر الفانيلين فقد أمكن تحضيرها من مصادر أخرى منها مادة كونيفرين Coniferin الموجودة فى جذوع بعض أنواع أشجار الصنوبر. وتحضر أيضا من اللجنين Legnin الموجود فى لب الخشب وهو ناتج ثانوى من صناعة الورق. كما يمكن تحضير مادة الفانيلين من مادة إجينول Eugenol وهى مادة فينولية موجودة فى زيت القرنفل.

٣ – المواد المكسبة للطعم فى البصل والثوم

يظهر الطعم المميز للبصل والثوم نتيجة تأثير إنزيم الألينيز Alliinase على بوادىء وسطية ناتجة من تحلل إنزيمى لمركب S- alkyl- cysteine sulphoxide. ولذلك يستلزم وجود هذا المركب مع إنزيم الألينيز فى مزارع الخلايا للحصول على أفضل النتائج. ومن خلال مزارع الخلايا المعلقة للبصل أمكن تنشيط الخلايا بتغذيتها على بوادىء مكسبات الطعم وفى وجود إنزيم الأليينز فى البيئة الغذائية. وثبت بالتجربة أن مركب ^{14}C-labelled S- (2- carboxypropyl)- L- Cysteine هو البادىء لمركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine، والمركب الأخير هو بادىء أيضا. ومضمون هذه التجربة أن مسارات التفاعل المذكورة يتم التعبير عنها حتى فى الزراعات المعملية غير القادرة للوصول إلى الطعم النهائى المميز للبصل. وثبت أن المستويات المنخفضة (٠,٥ ملليجرام/ لتر) من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية لنمو كالس البصل أدى إلى تنشيط تراكم المركب S- trans prop- 1-enyl- L- cysteine sulphoxide للوصول إلى مستوى ٤٠٪ من التركيز الموجود فى البصل. وهذه المزروعات الخلوية لها القدرة على إنتاج مركبات مميزة لطعم البصل لأن لها القدرة على تكوين كل البوادىء الأساسية له (Musker, et al. 1988). كذلك ثبت أن المستويات المنخفضة من منظم النمو Picloram فى البيئة الغذائية تنشط تكوين

الجذور ونمو البراعم الخاصة بالنموات الخضرية، بينما المستويات المرتفعة من هذا الهرمون تؤدى إلى تكوين بادىء السلفوكسيد Sulphoxide precursor بدون حدوث تكشفات للبراعم والجذور. وعلى ذلك فليس من الضرورى الربط بين العمليتين (Col-lin et al. 1989).

٤ – زيت النعناع Mint essential oil

مزارع الكالس لخلايا النعناع *Mentha piperita* عادة منخفضة فى إنتاجيتها من زيت النعناع. وهو زيت ترتفع فيه نسبة كل من مادتى Menthofuran; Pulegone بالمقارنة بنبات الأم الذى يحتوى على نسبة مرتفعة من الزيت الكلى الذى يسود فيه مادتا Menthone; Menthol. كذلك ثبت وجود تربينات أحادية Monoterpenes فى مزارع السلالات الخلوية Cell lines للنعناع بنسب صغيرة ووحيدة ضمن مكونات الزيت الطيار بالإضافة إلى كميات شحيحة من مركبات Neomenthol; Menthone ;Neomenthyl acetate. ولا توجد خلايا تحتوى على Menthol. ويعزى عدم تجمع التربينات الأحادية فى خلايا النعناع إلى سرعة تحللها أكثر من بنائها فى الخلية لأنها مركبات سامة Phyto- toxic متجمعة ومعزولة خارج الخلايا فى مكان بين جدار الخلية وكيوتيكل الخلايا المفرزة للغدد الزيتية. وفى زراعة الأنسجة لايوجد فاصل فيزيقى بين بناء وتخزين التربينات الأحادية ولا توجد وسائل تحمى التربينات من التحلل المباشر وهى فى بداية نشأتها. كما ثبت أن زراعة الخلايا على بيئة غذائية ثنائية المظهر Two phase systems مفيدة فى تشجيع تراكم التربينات من بعض الأنواع النباتية. وأن المركبات المحبة للدهون Lipophilic مثل الجليسريدات الثلاثية ومنها مركب Myglyol مفيدة لادمصاص وتنظيم التربينات الأحادية المفروزة فى البيئة الغذائية للخلايا. ويمكن القول بأن وجود مركبات الادمصاص غير القطبية Non- polar adsorbents له أهميتها لتتبع تراكم التربينات الأحادية. وبالرغم من النجاح المحدود فى مزارع خلايا كالس النعناع غير المتكشف، إلا أن كالس نوع النعناع *M. piperita* المتكشف أعطى نموات خضرية وأنتج كميات معنوية من التربينات الأحادية الطبيعية.

٥ – مكسبات طعم الفاكهة Fruit flavours

توجد مركبات معقدة مكسبة لطعم الفاكهة أهمها مكسبات طعم الفراولة والموالح. ويستخدم مكسب طعم الفراولة على نطاق واسع فى الصناعات الغذائية. وحدث تطور محدود فى زراعة الأنسجة للحصول على طعم الفراولة (Hong, and Harlander, 1989). ويشترك حوالى ٢٠٠ مركب فى إظهار طعم الفراولة منها إسترات Esters وكيتونات Ketones وكحولات Alcohols وأحماض عضوية Organic acids ولاكتونات Lactoes والفيورانات Furans. ومكسبات طعم الجوافة من المركبات الهامة والمعقدة. وفى دراسة تحليلية لكالس ناتج من خلايا ثمار الجوافة استخدم فيها جهاز Gas chromatogrqaphy (GC) تم التعرف إلى ١٩ مركبا متطايرا من ٥٨ مركبا موجودة أصلا فى ثمار الجوافة.



الباب العاشر

ملاحق Appendixes

١- بيئات غذائية Media

الرمز الاختزالى للبيئة	المرجـــع
A	Anderson (1978)
B5	Gamborg et al. (1968)
ER	Erikkson (1965)
KC	Knudson C medium (1922)
KCBP	Knudson C medium + B + P (1946)
KCS	Knudson C medium + CW + S (1946)
LS	Linsmaier and Skoog, 1965
MS	Murashige and Skoog (1962)
MT	Murashige and Tucker (1969)
NN	Nitsch and Nitsch (1969)
SH	Schenk and Hildebrandt (1972)
VWN	Vacin and Went medium (1949)
VWS	Vacin and Went medium + S + CW

تابع (١- بيئات غذائية)

الرمز الاختزالى للبيئة	المرجـــع
Tch	Vacin and Went medium + AC + T
VWM	Vacin and Went medium + B + CW + T
WH	White's medium (1963)
WPM	Woody Plant Media

٢- منظمات نمو Growth regulators

الرمز الاختزالى	المركـــب
ABA	Abscisic acid
ALAR	Succinic acid 2,2- methyl- hydrazide.
AZI	7- Aza- Indole.
BA	6- Benzyl Adenine
6BAP	6- Benzyl Amino Purine.
BTAA	2- Benzo Thiazole Acetic Acid.
BUDR	5- bromodeoxyuridine
CCA	Cellulose Crystallite Aggregate.
CCC	Chlormequat- 2 Chloroethyl trimethyl ammonium Chloride.

تابع (٢- منظمات نمو Growth regulators)

الرمز الاختزالى	المركـــب
CPA	(4- Chlorophenoxy) acetic acid.
2,4- D	(2,4- Dichlorophenoxy) acetic acid.
DCMU	3- (3,4- Dichlorophenyl- 1,1- Dimethyl Urea.
DPU	Phenylurea and its derivatives.
HNB	5- Hydroxy Nitro Benzyl- bromide.
IAA	Indole- 3- Acetic Acid.
IBA	Indole- 3- Butyric Acid.
2iP	6- y- y- Dimethyl ally Amino Purine
IPA	(2- Isopentenyl) adenine.
GA3	Gibberellic Acid, (Gibberellin A3).
KIN	Forfuryl- Amino Purine (Kinetin).
NAA	1- Naphthalene Acetic Acid.
NOA	2- Naphthoxy Acetic acid.
PIC	Picloram (4- amino- 3,5,6- trichloropicolinic acid).
PBA	{6- (Benzylamino)- 9- (2- Tetrahydropyranyl)- 9H- purine)}.
2,4,5- T	(2.,4, 5- Trichlorophenoxy) acetic acid.

تابع (٢- منظمات نمو Growth regulators)

الرمز الاختـزالى	المركـــب
TCP or (Pichloram)	4- Amino- 3,5,6- Trichloropicotinic Acid.
TIBA	2, 3, 5- Triiodobenzoic acid.
WPM	Woody Plant Media.
ZEA	.5- (4- Hydroxy- 3- Methyl- trane2- Butenylamine) Purine (Zeatin = Riboside)

٣- إضافات Additives

الرمز الاختـزالى	المركـــب
AC	Active charcoal.
ACP	Acid phosphatase
AdS	Adenine Sulfat
ADE	Adenine.
ALAR	Succinic acid 2,2- methyl– hydrazide
ALK	Alkaline phosphatase
Arg	Arginine
As	Ascorbic acid

تابع (٣- إضافات Additives)

الرمز الاختزالى	المركـــب
Asp	Asparagine
AZI	7 Aza– Indole
Bio	Biotin
Ca	DL- Catechin
CaP	Ca pantothenate
CAT	Catalase.
CCC	2 Chloro– ethytriethyl ammonium chloride
Cg	Chlorogenic acid
CH	Casein hydrolysate (edamin).
Ch	Choline chloride
Cm	Corn milk
CW (CM)	Coconut water (Coconut milk).
Cys	Cysteine.
DIECA	Diethyl- dithio carbonate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPU	Phenylurea and its Derivatives
EDTA	Ethylene- Diamin- Tetra Acetic acid.

تابع (٣- إضافات Additives)

المركـــــب	الرمز الاختـزالى
Ethyl Methane Sulphonate	EMS
Esterase	EST
Furfural Amino Purine	FAP
Folic acid	Fol
Glutamine.	Glu
Lactalbumin hydrosate	LH
Malt extract.	ME
5- Hydroxy Nitro Benzyl – bromide	NHB
Polyethylene glycol	PEG
Para fluorophenyl alanine	PEP
Phloroglucimol	PHG
Polyphenol oxidase	PPO
Pyridyl-Phenyl Urea	PPU
Peroxidase.	PRX
Sugar	S
Superoxidas dismutase.	SOD

مراجع

– مراجع باللغة العربية:

شـربـاش– محمود توفيق محمد ١٩٩٥. تكنولوجيا الإشعاع فى الأغذية والزراعة. إصدار المنظمة العربية للتنمية الزراعية والهيئة العربية للطاقة الذرية.

– مراجع باللغة الإنجليزية:

- Amina, A. A. 2000. Ph. D. Thesis, Dept. of Biochemistry, Fac. of Agric., Cairo Univ.

- Anonymous, 1978. Plant tissue culture. Pitman, Boston: 769- 773.

- Asmahan, A. Mahmoud (2000). J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 25 (10): 6167- 6165.

- Bajaj. Y. P. S. 1975. Protoplast culture and production of haploids. In: From, Structure and Function in Plant. p. 107- 113. Sarita Prakashan Press, Meerut, India.

- Bajaj. Y. P. S. 1977. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissuc and Organ Culture, (Reinert and Bajaj, eds.), PP. 468- 96. Springer-Verlag, Berlin.

- Bajaj. Y. P. S. 1979b. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm Euphytica, 28: 267- 285.

- Bajaj. Y. P. S. 1981a. Plant genetic conservation through tissue culture. Proc. Intern. Workshop Improvment of Tropical Crops Through Tissue Culture, Dacca Univ., Dacca, Bangladesh, 44- 46.

- Collin, H. A. Musker, D. and Britton, G. 1989. in "Primary and secondary Metabolism of Plant Cell Cultures" II ed. W. G. W. Kurz. Springer- Verlag. Berlin. p. 125.

- De Langhe, E. and De Bruijne, E. 1976. Continuous propagation of tomato plant by means of callus culture. Sci. Hortic. 4: 221- 227.

- George, E. F., 1993. in: plant Propagation by Tissue culture- part 1: The technology Edington; Exegetics, vol. 1.

- He, D. G. and Ouyang, J. W., 1980. In: Annual Report of the Instit. of Genetics, Academia Sinica, 1979, p. 74.
- Hoda, E, M. 2000. ph. D. Thesis, Dept. of Genetics, Fac. of Agric., Ain Shams Univ.
- Hong, Y. C. and Harlander, S. K. 1989. in "Flavor Chemistry of Lipid Food. (ed. D. B. Min and T. H. Smouse), AOCS. Champaign, Illinois, p. 348.
- Horgan, 1986. Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr. 6: 295.
- Institute of tobacco, breeding group, Shantung Province, and Institute of Botany Academia Sinica. 1974a. Acta Bot. Sin. 16: 301- 303.
- Iwai and Kishi, 1986. Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr., 6: 82.
- Lloyd and Mc Cown, 1980. Comb. Proc. Int. Plant Tissue and Cell Culture, Leicester: 46.
- Maliga, P., Breznovites, A. S. and Morton, L. 1973. Streptomycin- resistant Plants from callus culture of haploid tobacco. Nature New Biol. 244: 29.
- Meyer and Kernsh. 1986. Int. Congr. plant Tissue Cell Culture Abstr., 6: 149.
- Morel. G. 1960. Am. Orchid Soc. Bull. 29: 495- 497.
- Morel, 1964. Rev. Hort. Ann. Soc. Nat. Hort., France, 136: 733- 740.
- Mori et al. 1982. Proc. 5th Cong. Plant Tissue Cell Culture. 5: 803- 904.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Physiol. Plant. 15: 473- 97.
- Murashige, T. and Tucker, D. P. H. 1969. Proc. 1st. Int. Citrue Symp. (3): 1155- 1161. (c. f. Amer. Soc. Hort. Sci., 1205 (6): 902- 905.
- Musker, D., Collin, H. A., Britton, G. and Ollerhead, G. 1988. in "Manipulating Secondary Metabolism in Cultures." Cambridge Univ. Press. Cambridge. P. 177.
- Nitsch, C. 1977. In: Applied and fundamental aspects of Plant cell, tissue and organ Culture (Reinert and Bajaj Eds), p. 268- 278. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y.
- Nitsch, J. P. and Nitsch, C 1969. Haploid Plants from pollen grains. Science 163: 85- 87.

- Noha, E. R. H. E. 2001. M. Sc. Botany (Physiology) Dept. Fac. of Girle for Arts, Science and Education, Ain Shams Univ. Cairo, Egypt.
- Pierik, R. L. M, 1997. In vitro cultures of higher Plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Sadik, A. S. 1994. Studies on viruses affecting banana in Egypt. Ph. d. Thesis, Dept. of Agric. Microbiology, Fac. Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt.
- Sharabash, M. T. M. (1977). 1. Effects on retention of ^{14}C in the leaf. Egypt. J. Bot. 20 (1), pp. 49- 57.
- Sharabash, M. T. M. 1980. Translocation patterns of ^{14}C in Vicia faba plants, arising from $^{14}CO_2$ assimilates, as influenced by three $^{12}CO_2$ levels. Egypt. J. Bot. 23 (2), pp. 89- 98.
- Sharabash, M. T. M. (1981a). Effect of CO2 conentration on retention and distrbution pattern of radiocarbon in Vicia faba Plant. Egypt. J. Physiol. 8 (2) pp. 169- 176.
- Sharabash, M. T. M. (1981b). II. Effects on distribution pattern of ^{14}C assimilation. Egypt. J. Physiol. 8 (2), pp. 177- 185.
- Sharabash, M. T. M. 1997. in- vitro techniques for selecting radiation-induced mutants adapted to adverse environmental conditions. FAO/ IAED, Jul., 1997, Doc. 85: 55- 58.
- Sharp, W. R., Raskin, R. S., and Sommer, H. E., 1972. The use of nurse culture in the devolopment of haploid clones in tomato. Planta 104: 357- 361.
- Skoog and Miller, 1975. Symp. Soc. Exp. Biol. No. 11, The biological action of growth substances, p: 118- 131.
- Skoog and Tsui, 1948. Am. J. Bot. 35: 782- 787.
- Van Aartrijk, J. and Van derLinde, P. C. G. 1986. in- vitro propagation of flower bulb crops. In: Tissue culture as a Plant Production system for horticultural crops. (R. H).
- Van Straten, S. 1977. in "Volatile compound in food." 4th Edn., Central Institute for Nutrition and Food Research. Zeist, Netherlands.

- Wang, Y. Y., Sun, Wang, C. S., and Chien, N. F. 1973. The induction of the pollen plantlets of Triticale and capsicum annuum from anrther culture. Sci. Sin. 16: 147- 151.
- Wenzel, G. and Uhrig, H. 1981. Breeding methods and virus resistance in potato via anther culture, Theor. Appl. Genet. 59: 333- 340.
- White, 1934a. Plant Physiol. 9: 585- 600.
- White, P. R. 1963. The cultivation of Animal and Plant cells, 2nd. Ronald Press, N. Y.
- Yin, K. C., Hsu, C., Chu, C. Y., F. Y., Wang, S. T., Liu, T. Y., Chu, C. C., Wang, C. C. and Sun, C. 1976. A study of the new cultuvar of rice raised by haploid breeding method. Sci. Sinica, 19: 227- 242.
- Zhou, C. and Yang, H. Y. 1980. Anther culture and androgenesis of Hordeum vulgare L. Acta Genet. Sin. 7: 287.

